



Liens entre la morphologie et les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain

Florence Boitrelle

► To cite this version:

Florence Boitrelle. Liens entre la morphologie et les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain. Médecine humaine et pathologie. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. <NNT : 2014VERS0028>. <tel-01338125>

HAL Id: tel-01338125

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01338125>

Submitted on 28 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines
Ecole doctorale GAO « des Génomes aux Organismes »
Equipe d'accueil EA 2493

DIPLOME DE DOCTORAT

En vue d'obtenir le grade de Docteur ès Sciences

Thèse présentée et soutenue publiquement le 27 juin 2014 par

Florence BOITRELLE

**Liens entre la morphologie, les marques épigénétiques, la
qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les
capacités fécondantes du spermatozoïde humain**

Sous la direction du Professeur Jacqueline SELVA

Membres du Jury :

Président du jury: Monsieur le Professeur Bernard MIGNOTTE

Rapporteur: Monsieur le Professeur Jean François GUERIN

Rapporteur: Monsieur le Professeur Joël DREVET

Examineur : Madame le Professeur Catherine PATRAT

Examineur : Madame le Docteur Martine ALBERT

Directeur de thèse : Madame le Professeur Jacqueline SELVA

Remerciements

A Monsieur le Professeur Bernard MIGNOTTE,

Merci d'avoir accepté de présider ce jury. Merci de m'avoir accueillie dans votre EA et de m'avoir guidée avec bienveillance depuis les tous premiers jours de ces recherches. Votre capacité d'analyse et votre esprit de synthèse sont pour nous, étudiants, d'une aide précieuse.

A Monsieur le Professeur Jean-François GUERIN,

J'ai eu plusieurs fois l'occasion d'apprécier votre capacité de synthèse, vos qualités didactiques et vos qualités humaines. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Merci de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. J'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

A Monsieur le Professeur Joël DREVET,

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. J'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes. Merci pour votre esprit critique, vos capacités d'analyse, vos remarques, vos « bonnes idées » et vos conseils qui m'ont été d'une aide précieuse dans la poursuite et l'aboutissement de ce travail de thèse.

A Madame le Professeur Catherine PATRAT,

J'ai eu plusieurs fois l'occasion d'apprécier votre capacité de synthèse et vos qualités didactiques. Ces qualités sont pour moi des modèles à suivre. Merci de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

A Madame le Docteur Martine ALBERT,

Martine, mille mercis...si cela pouvait suffire à exprimer la joie que j'ai de travailler à tes côtés. J'ai, tous les jours, l'occasion d'apprécier tes qualités humaines, ta sympathie, ton humour mais aussi tes capacités didactiques et ton esprit critique. Merci pour cette véritable passion du spermatozoïde que tu m'as transmise. Sans toi, rien de tout cela ne serait arrivé...en tous cas pas comme ça, c'est certain !

Merci d'avoir accepté de juger ce travail que tu connais très bien. J'espère qu'il est à la hauteur de tes attentes. En fait, Merci pour tout et pour tout ce qu'on n'écrit pas dans un mémoire de thèse...

A Madame le Professeur Jacqueline SELVA,
Jacqueline, un très grand Merci.

Merci de m'avoir accueillie dans votre service il y a quatre ans maintenant. Avant de m'en rendre compte au jour le jour, j'avais déjà pu apprécier plusieurs fois votre esprit critique, votre capacité de synthèse et vos qualités didactiques. Merci pour votre disponibilité, pour cette facilité à synthétiser des notions parfois complexes, pour votre soutien et pour cette envie que vous savez transmettre de toujours faire au mieux et de finir ce qu'on a commencé. Merci de m'avoir guidée et soutenue tout au long de cette thèse. J'espère que ce travail est à la hauteur de vos attentes.

Soyez assurée, Jacqueline de toute mon estime et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD,

Merci pour vos remarques et vos conseils qui m'ont aidée dans la poursuite de ce travail de thèse.

A vous tous,

A François que j'appelle Professeur maintenant...Merci pour tout, pour ton dynamisme, ton envie d'aller de l'avant et pour notre amitié. Sans toi, les choses ne se seraient pas faites aussi facilement et aussi rapidement. Merci pour ton soutien au quotidien, ta bonne humeur et cette formidable envie de faire mille projets à la fois. J'ai parfois du mal à suivre mais il paraît que c'est normal ; je ferai au mieux tu le sais bien.

Merci pour tout en tous cas et vive la Recherche, la fac et Poissy.

A Marc, Bob, Samuel, Denise, Joëlle, Marianne, pour toutes ces discussions parfois nocturnes...sans vous Poissy ne serait pas Poissy...Merci pour votre soutien, votre amitié, votre sympathie et vos idées sur à peu près tout. C'est un plaisir de travailler avec vous...

A Cécile, Patrick, Mimi, Vince, Fabrice, Romain et Annabelle, la force tranquille du laboratoire d'AMP (si si Fabrice c'est tout comme)...Merci pur tous ces moments partagés, votre humour, votre capacité à me supporter dans tous les sens du terme...Merci d'avoir été là quand il le fallait, pour ces heures de pêche aux spermatozoïdes pendant lesquels vous animiez la salle de culture, pour votre soutien de tous les jours, votre humour et pour me dire aussi qu'il faut que je lève un peu le pied...Merci

A Fatma et Séverine, les open spaceuses du premier jour, A celles qui vous ont suivies et notamment à Laura, Nelly et Marine : Merci d'être comme vous êtes... Ce fût et ce sont toujours des supers moments...Merci pour votre amitié, j'espère que le Meilleur vous accompagnera toujours. C'est un plaisir de travailler avec vous : Merci et longue route...

A Béné, les Céline, Méryl, Alain, Antoine, Audouin, Véronique, Marie Jo, Lili, Annie, Marie, Ibrahim et Bérénice, à toutes ces personnes qui font que Poissy sera toujours Poissy : Merci.

A Nathalie Beaujean pour nos futures collaborations....

A Geoffroy, Perrine, Pau, Char, à mes amis, merci d'être vous...et à très bientôt pour se faire une petite bouffe ????

A ma famille, A mes parents, Mam et Papa, A ma sœur Audrey, A Fabrice, à mon neveu Alban et A Pierre, mon chéri : tout le monde ici a beaucoup entendu parler de vous, surtout du petit dernier de la famille...

Merci pour votre soutien sans condition, ces longues discussions sur le sens de « tout », ces longues discussions sur le « qu'est-ce que je vais bien pouvoir (vouloir ?) faire après », pour tous nos moments de bonheur et de joie au quotidien et ces petits « rien » qui font tout... Merci à vous et merci pour tout !

A ce (top ?) spermatozoïde sans qui rien ne me serait arrivé...

INTRODUCTION.....11

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES17

LE SPERMATOZOÏDE HUMAIN: SPERMATOGENESE, MORPHOLOGIE ET FONCTIONS

SPERMATIKES.....18

I. LA SPERMATOGENÈSE19

1. Lieu de la spermatogenèse19

a. Les testicules19

b. Les tubes séminifères21

2. Déroulement de la spermatogenèse22

a. Les mitoses goniales22

b. La méiose24

c. La spermiogenèse24

d. Le cycle de l'épithélium séminifère et régulation de la spermatogenèse25

II. FOCUS SUR LA SPERMIOGENESE25

1. Mise en place de l'acrosome27

2. Elongation du noyau et condensation de la chromatine27

3. Mise en place du flagelle30

III. STRUCTURE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN31

1. La tête31

2. Le flagelle32

IV. FONCTIONS DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN32

1. Rôles dans la fécondation32

2. Rôles dans le développement embryonnaire33

L'INFERTILITE MASCULINE: DEFINITION DE L'INFERTILITE ET EXPLORATION DES

ANOMALIES SPERMATIKES SUR SPERMATOZOÏDE FIXE ET VIVANT35

I. L'INFERTILITE MASCULINE36

1. Définition de l'infertilité masculine36

2. Moyens d'exploration de l'infertilité masculine37

3. Principales étiologies d'infertilité masculine37

4. Prise en charge de l'infertilité masculine et du couple38

a. La fécondation in vitro avec micro-injection du spermatozoïde (ICSI)38

b. L'ICSI avec pré-sélection du spermatozoïde à fort grossissement (IMSI)39

II. LES MOYENS D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DES FONCTIONS DU SPERMATOZOÏDE

HUMAIN FIXE40

1. Le spermogramme: un examen de base40

2. Moyens d'étude de la morphologie des spermatozoïdes fixés	41
a. Le spermocytogramme.....	41
b. La microscopie électronique	42
3. Moyens d'étude du noyau des spermatozoïdes fixés	43
a. L'étude des marques épigénétiques spermatiques	44
b. L'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique.....	47
c. L'étude du contenu chromosomique spermatique	49
4. Moyens d'étude de l'acrosome des spermatozoïdes fixés	49
III. LES MOYENS D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DES FONCTIONS DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN VIVANT	51
1. Moyens d'étude de la morphologie des spermatozoïdes vivants	51
a. Etude de la morphologie des spermatozoïdes vivants au grossissement de l'ICSI	51
b. Le MSOME (Motile Sperm Organellar Morphology Examination)	52
2. Moyens d'étude du noyau et de l'acrosome des spermatozoïdes vivants	54
<u>METHODES.....</u>	<u>56</u>
I. METHODES DE SELECTION DES SPERMATOZOÏDES	57
1. Préparation de la fraction migrée de spermatozoïdes	57
2. Sélection des spermatozoïdes au grossissement de l'ICSI	57
3. Sélection des spermatozoïdes au grossissement de l'IMSI	58
II. ÉTUDE DES QUALITES NUCLEAIRES SPERMATIQUES	58
1. La coloration au bleu d'aniline acétifié	58
2. La technique TUNEL <i>in situ</i> sur spermatozoïdes	59
3. La technique de FISH sur spermatozoïdes	60
III. ETUDE DE LA REACTION ACROSOMIQUE.....	62
IV. MISE AU POINT DE L'ASSOCIATION DE PLUSIEURS MICROTECHNIQUES SUR LE MEME SPERMATOZOÏDE.....	63
1. Etude de plusieurs caractéristiques nucléaires sur un même spermatozoïde: bleu d'aniline acétifié-TUNEL-FISH (X,Y,18)	64
2. Etude d'une caractéristique nucléaire et d'une caractéristique acrosomique d'un même spermatozoïde: bleu d'aniline acétifié- lectine PSA	66
3. Etude d'une caractéristique nucléaire et de la morphologie précise d'un même spermatozoïde : bleu d'aniline acétifié-coloration de Papanicolaou	66
V. APPROCHES MICROSCOPIQUES UTILISANT DES TECHNOLOGIES INNOVANTES	67
1. AFM : Microscopie à force atomique	67
2. Microscopie à sectionnement optique et déconvolution	68

RESULTATS	<u>71</u>
PARTIE 1 : LIENS ENTRE LA MORPHOLOGIE, LES MARQUES EPIGENETIQUES, LE CONTENU CHROMOSOMIQUE ET LES CAPACITES FECONDANTES DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN.....	75
I. MORPHOLOGIE SPERMATIQUE ET CONDENSATION DE LA CHROMATINE (ARTICLES 1,2,3) ...	76
1. Etablir des liens entre la morphologie du spermatozoïde vivant en IMSI (x10.000) et la condensation de sa chromatine	76
a. La nature des larges vacuoles.....	77
b. La nature des petites vacuoles	80
2. Etablir des liens entre la morphologie du spermatozoïde fixé (x1000) et la condensation de sa chromatine	82
II. MORPHOLOGIE SPERMATIQUE SUSCEPTIBILITE AUX DOMMAGES DE L'ADN (ARTICLE 4)	85
III. MORPHOLOGIE SPERMATIQUE ET CONTENU CHROMOSOMIQUE (ARTICLES 5 ET 6)	87
PARTIE 2 APPLICATIONS CLINIQUES.....	96
I. IMSI ET CONGELATION SPERMATIQUE (ARTICLE 7).....	97
II. INDICATIONS ET RESULTATS DE L'IMSI (ARTICLE 8).....	100
DISCUSSION	<u>103</u>
PERSPECTIVES.....	<u>112</u>
CONCLUSIONS	<u>117</u>
ABREVIATIONS.....	<u>120</u>
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	<u>122</u>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	<u>127</u>
ANNEXES.....	<u>138</u>

Introduction

Le spermatozoïde tire son nom du préfixe grec « *sperma* » désignant la « semence, la graine » et du suffixe « zoïde » signifiant « ce qui est semblable à un animal ». Découvert en 1677 par le microscopiste hollandais Antoine Van Leeuwenhoek, le spermatozoïde fût d'abord considéré comme un parasite du sperme, sans fonction apparente. Quelques années plus tard, en 1694, Nicolas Hartsoeker croit en la « toute-puissance » du spermatozoïde puisque ses observations microscopiques l'amènent à soutenir la théorie selon laquelle le spermatozoïde contiendrait la réplique en miniature d'un être humain préformé. Il appellera alors le spermatozoïde « homoncule », du latin *homonculus* signifiant « petit homme ». Puis, il faudra attendre près de 200 ans et la fin du XIX^{ème} siècle pour que le mécanisme de la fusion gamétique soit appréhendé par Oscar Hertwig et Herman Fol. Ce bref rappel d'histoire spermatique nous amène aux années 2000, et nous allons voir ici que plusieurs siècles après sa découverte, le spermatozoïde fait toujours parler de lui et qu'il recèle encore quelques secrets. Après des rappels indispensables sur la structure du spermatozoïde, ses fonctions et leurs moyens d'étude, nous essaierons d'établir des liens entre la morphologie et les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain vivant. Ainsi, dans le domaine de l'assistance médicale à la procréation (AMP) nous tenterons de définir les critères de choix du spermatozoïde humain vivant, c'est-à-dire les critères qui nous permettraient de sélectionner **LE spermatozoïde**, celui qui présenterait le moins de risques d'échec d'implantation embryonnaire et/ou d'anomalies pour la descendance.

L'Assistance Médicale à la Procréation est en effet une discipline médicale qui tente de diagnostiquer et de remédier à l'infertilité des couples, en utilisant bien souvent des spermatozoïdes physiologiquement non fécondants. L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'infertilité d'un couple dont la femme est en âge de procréer (18-45 ans) comme « l'incapacité à concevoir ou à obtenir une grossesse au delà d'un délai de 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés » (WHO 2000).

A travers le monde, l'infertilité toucherait des dizaines de millions de personnes, soit 10 à 15 % des couples (WHO 2010a ; Boivin et al. 2007 ; Louis et al. 2013). Depuis plusieurs années, la part de l'homme dans les infertilités du couple est en augmentation et on estime aujourd'hui qu'un facteur causal masculin (identifié ou non) est impliqué dans la moitié des cas (Thonneau et al. 1991 ; WHO 2010a ; Jungwirth et al. 2012)

Le diagnostic de l'infertilité masculine est donc primordial et repose essentiellement aujourd'hui sur l'examen andrologique et le spermogramme. Chez ces hommes infertiles, de

nombreuses causes d'infertilité peuvent être retrouvées. Ceci dit, 30 à 45% des infertilités masculines (diagnostiquées comme telles devant la normalité du bilan féminin et la présence d'une ou plusieurs altérations des paramètres spermatiques étudiés lors du spermogramme) demeurent idiopathiques. Il est important de s'attarder un peu sur ce terme « d'idiopathique ». L'infertilité masculine est dite idiopathique quand aucune des causes recherchées n'est retrouvée. Et c'est bien là toute la question...en effet devant des altérations spermatiques au spermogramme, combien de professionnels de l'AMP lancent des explorations fonctionnelles spécialisées du spermatozoïde ? L'ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) permet en effet de pallier les infertilités masculines les plus sévères (Palermo et al. 1992). Oui l'ICSI est une technique dont l'efficacité n'est plus à prouver. Oui, elle a permis d'étoffer l'éventail des techniques utilisables en AMP. Oui l'ICSI s'avère très utile chez les patients dont la spermatogenèse est très altérée. En effet, l'ICSI « féconde » puisqu'elle permet au spermatozoïde de forcer les verrous ovocytaires, de passer les barrières naturelles, de « shunter » les premières étapes de la fécondation et de permettre ainsi à des hommes infertiles de devenir père. Un seul spermatozoïde vivant, même immature, autrement dit « n'importe quel » spermatozoïde, devient en effet capable de féconder un ovocyte... Mais l'ICSI n'a-t-elle pas aussi relégué, pour un temps, le spermatozoïde à un rôle quasi accessoire ? La question qu'on peut alors se poser, une vingtaine d'années après la découverte de l'ICSI, c'est « Pourquoi continuer à s'intéresser au spermatozoïde ? »

En fait, depuis quelques années, le(s) rôle(s) du spermatozoïde ont été « revisités ». Cette citation du Pr Krawetz en 2005 (Ainsworth 2005), résume bien ce que certains biologistes et gynécologues de la reproduction ont pu avoir à l'esprit il y a quelques années : « *The idea was that the egg was supplying everything and Dad was just tagging along with his DNA.* » Cette idée de la toute-puissance de l'ovocyte et cette image du père réduite à l'ADN de son spermatozoïde sont des images à revisiter aujourd'hui. Le spermatozoïde ne peut pas (plus) être considéré comme un simple transporteur d'ADN paternel. Il est clairement établi aujourd'hui que le spermatozoïde a un rôle indispensable dans l'activation ovocytaire mais aussi dans le développement embryonnaire précoce et tardif. Ce spermatozoïde contiendrait d'ailleurs 3000 types d'ARN messenger différents dont certains codent pour des protéines impliquées dans le développement embryonnaire, d'autres codant pour des protéines inconnues jusqu'à lors mais sans équivalent au niveau ovocytaire (Ostermeier et al. 2002 ; Ainsworth 2005). De plus, il faut aussi garder à l'esprit que la population spermatique d'un même éjaculat est hétérogène, qu'un spermatozoïde « n'en vaut pas forcément un autre » et

se rappeler que la qualité du spermatozoïde à injecter est une donnée à ne pas négliger. En effet, depuis quelques années, les taux de grossesse en ICSI plafonnent (aux alentours de 30% par transfert en France selon des données récentes de l'Agence de Biomédecine). De nombreux progrès ont été réalisés notamment dans les protocoles d'hyperstimulation programmée de la patiente, le respect de la chaîne du froid et de l'obscurité des ovocytes, l'amélioration des milieux de culture embryonnaire, le choix du nombre et de la qualité des embryons à transférer.... Mais il est parfaitement admis par exemple que plus la spermatogenèse est altérée, plus la qualité spermatique à l'échelle d'un spermatozoïde peut être altérée. De plus, d'après une méta-analyse récente, les enfants nés suite à une ICSI présenteraient un sur-risque de malformations congénitales, un sur-risque de petit poids à la naissance et les grossesses post ICSI, un sur-risque de mortalité périnatale (entre autres) comparativement aux grossesses naturelles (Pandey et al. 2012). Ces données sur les naissances post-ICSI sont des arguments supplémentaires pour pousser un peu plus loin l'étude de la qualité embryonnaire, ovocytaire mais aussi, pour ce qui nous intéresse ici, spermatique.

Sous le terme « qualité spermatique » on pense non seulement à l'aptitude du spermatozoïde à féconder un ovocyte mais aussi à sa capacité à induire le développement d'un embryon viable capable de s'implanter et à plus long terme à la capacité du spermatozoïde à donner un bébé et un enfant en bonne santé. Ces dernières années, des tests destinés à explorer les qualités intrinsèques du spermatozoïde se sont développés : il s'agit de l'étude de la condensation de la chromatine et plus globalement des mécanismes épigénétiques qui entrent en jeu lors de la maturation du gamète mâle, de l'étude de la fragmentation et de la dénaturation de l'ADN ou encore de l'étude du contenu chromosomique spermatique. Ces tests ont un intérêt diagnostique voire pronostique des chances de grossesse pour un couple mais ils nécessitent la fixation ou le marquage des spermatozoïdes, ce qui compromet leur utilisation ultérieure en AMP. Parce que connaître la qualité du spermatozoïde vivant injecté est un enjeu majeur en ICSI, certains auteurs ont cherché à mieux observer ces spermatozoïdes. Parmi les quelques techniques d'observation du spermatozoïde vivant, le MSOME (high-magnification Motile Sperm Organelle Morphology Examination) décrit au début des années 2000 (Bartoov et al. 2001), a retenu toute notre attention. Le MSOME est une technique d'observation en contraste de Nomarski au grossissement x 6300 (ou plus) qui présente l'énorme avantage de pouvoir être réalisée sur des spermatozoïdes vivants, mobiles et en temps réel et qui permettrait de sélectionner extemporanément le « meilleur »

spermatozoïde à injecter en IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection). Effectivement, en 2003, l'équipe de Bartoov annonce la supériorité de l'IMSI sur l'ICSI en termes de grossesses évolutives chez des couples en échec d'ICSI (Bartoov et al. 2003). Pour ces mêmes auteurs, cette technique d'observation, le MSOME, permettrait au biologiste de détecter de « subtiles anomalies des têtes spermatiques » : les vacuoles, ces vacuoles « demeurant indétectables au grossissement x400 », grossissement classiquement utilisé pour l'ICSI (Bartoov et al. 2002).

Mais alors, la morphologie spermatique, telle qu'on l'observe aux grossissements de l'ICSI ou de l'IMSI, permet-elle de connaître la qualité nucléaire du spermatozoïde ?

Que sont les vacuoles ? Quelle est leur nature ? Ces vacuoles peuvent être petites, plus larges, superficielles, profondes, unique, multiples et être alors de natures différentes. Sont-elles acrosomiques ? nucléaires ? membranaires ? les trois ? Sont-elles en lien avec une non condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, un statut chromosomique particulier et donc plus largement en lien avec une qualité spermatique particulière ? un statut épigénétique particulier ? un contenu chromosomique particulier ? des capacités fécondantes particulières ? **Répondre à l'ensemble de ces questions a été le premier objectif de cette thèse.**

En répondant à ces questions, nous nous en sommes posé d'autres. **Faut-il aujourd'hui être « pro » ou « anti » IMSI ? L'IMSI donne-t-elle de meilleurs résultats que l'ICSI ? Dans quelles indications ? Pourquoi ? Y-a-t-il, plus globalement, des techniques d'observation spermatique meilleures que d'autres ? Peut-on améliorer encore notre vision du spermatozoïde vivant avant de le sélectionner pour l'injection ? Répondre à ces questions a été le deuxième objectif de cette thèse.**

Nous commencerons cette thèse par une revue bibliographique des données concernant la spermatogenèse, la structure et les fonctions du spermatozoïde. Cette première partie de rappels nous permettra d'insister sur la spermiogenèse qui est une étape clé de la différenciation spermatique au cours de laquelle le futur spermatozoïde subit de nombreux remaniements morphologiques et acquiert ses principales fonctions. Dans la deuxième partie des rappels bibliographiques, nous envisagerons l'infertilité masculine et détaillerons les divers moyens d'étude du spermatozoïde fixé ou vivant en insistant sur les moyens d'étudier sa morphologie, ses marques épigénétiques, ses qualités nucléaires, son contenu chromosomique et ses capacités fécondantes. Ces rappels bibliographiques nous permettront

d'expliquer l'objectif de cette thèse ; à savoir de sélectionner rien qu'en l'observant **LE spermatozoïde**, celui qui présenterait le moins de risque d'échec d'implantation embryonnaire ou d'anomalies pour la descendance.

Dans un deuxième temps, nous détaillerons les méthodes utilisées dans cette thèse.

Puis, nos résultats seront rapportés, discutés et présentés en deux parties. Dans la première partie, nous présenterons les différents travaux qui nous ont permis d'établir (ou non) des liens entre la morphologie, les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain vivant. La deuxième partie dégagera les applications cliniques qui découlent de ces liens.

Finalement, nous résumerons et discuterons les principaux résultats obtenus. Nous discuterons des perspectives que nous a ouvertes cette thèse et nous conclurons.

Rappels Bibliographiques

LE SPERMATOZOÏDE HUMAIN

spermatogenèse, morphologie et fonctions spermatiques

Le spermatozoïde humain est une cellule hautement différenciée, effilée, constituée d'une tête séparée de la pièce intermédiaire par le cou, et d'un flagelle constitué de cette pièce intermédiaire, d'une pièce principale et d'une pièce terminale. D'abord nous détaillerons les différentes étapes de la spermatogenèse en insistant sur la phase finale de la spermatogenèse qu'on appelle la spermiogenèse. Nous verrons que cette dernière étape est une étape clé dans la différenciation du futur spermatozoïde parce qu'elle associe des remaniements morphologiques et fonctionnels importants. Puis nous reviendrons sur la structure du spermatozoïde humain et sur ses principales fonctions.

I. La spermatogenèse

La spermatogenèse est une somme de mécanismes complexes qui correspond à la prolifération par divisions des cellules de la lignée germinale et à leur transformation, différenciation en spermatozoïdes.

1. Lieu de la spermatogenèse

a. Les testicules

La spermatogenèse se déroule dans les testicules (cf figure 1).

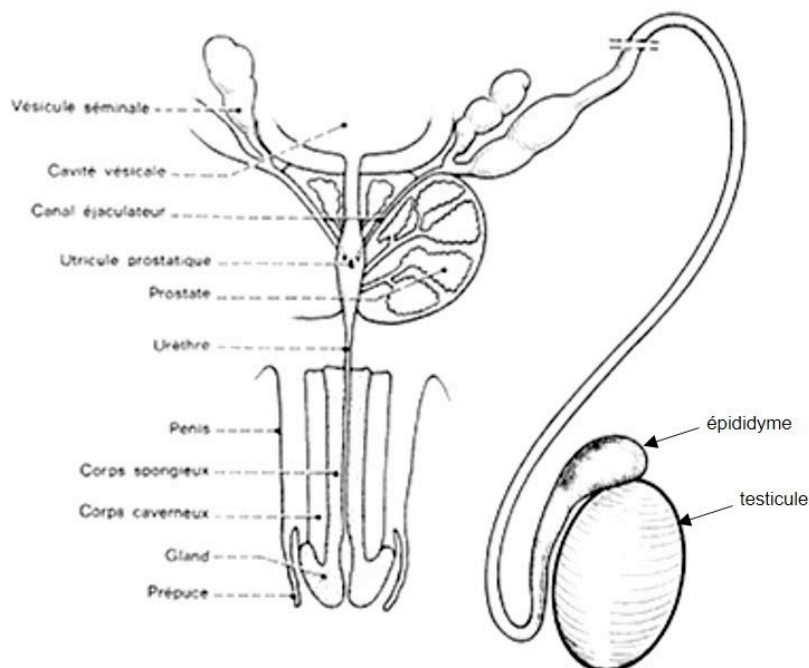


Figure 1 : Représentation schématique de l'appareil génital masculin. D'après *Bisson et al. 1980*.

Le testicule est un organe pair dont la principale fonction est d'assurer la production de spermatozoïdes. En dehors de cette fonction exocrine, le testicule est aussi impliqué dans la production endocrine d'« hormones mâles », les androgènes, au premier rang desquels on trouve la testostérone. Pour assurer ces fonctions et notamment la production de spermatozoïdes, le testicule est localisé dans le scrotum, à « l'extérieur » du corps, ce qui lui confère une température de 2 à 3°C inférieure à la température corporelle. Dans le scrotum, on trouve également l'épididyme et la partie initiale du canal déférent (Figure 2).

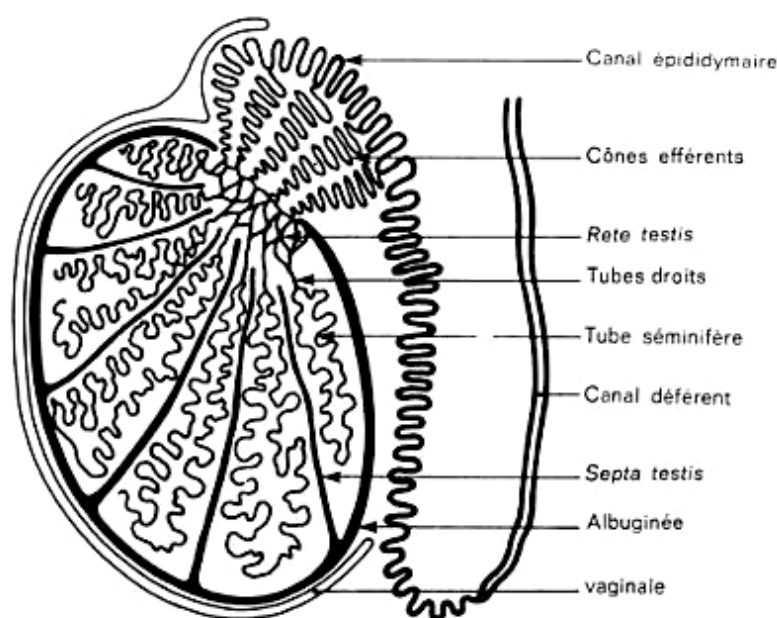


Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe de scrotum et de son environnement. D'après *Bisson et al. 1980*.

Un testicule normal mesure environ 5 cm de long, 3 cm de large et 2,5 cm d'épaisseur. Il est entouré d'une capsule conjonctive rigide : l'albuginée composée notamment de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses. L'albuginée envoie des cloisons conjonctives incomplètes qui vont permettre de délimiter le testicule en ce qu'on appelle des lobules testiculaires. Ces lobules testiculaires sont au nombre d'environ 300 par testicule. L'albuginée s'épaissit en arrière (au pôle postéro supérieur du testicule) pour former ce qu'on appelle le corps de Highmore qui est aussi le lieu de convergence des sommets des lobules testiculaires pyramidaux (Bisson et al. 1980).

b. Les tubes séminifères

La production de spermatozoïdes a lieu en intra testiculaire dans les tubes séminifères qui sont des tubes très pelotonnés situés dans les lobules séminifères (de 1 à 4 par lobule). La surface de l'ensemble de ces tubes dépelotonnés est évaluée à plusieurs centaines de mètres-carré. En dehors de ces tubes séminifères, on trouve le tissu interstitiel dans lequel sont présentes les cellules de Leydig groupées en îlots et productrices de testostérone.

Les tubes séminifères sont constitués d'un épithélium, « l'épithélium séminifère » qui borde une lumière centrale (Figure 3). Cet épithélium séminifère est limité à l'extérieur par une membrane, la lamina propria, constituée de laminine, de collagène et de cellules myoïdes périlitubulaires essentiellement. L'architecture de l'épithélium séminifère est assurée par des cellules de soutien, les cellules de Sertoli. Ces cellules de Sertoli n'ont pas qu'un rôle de soutien mais elles jouent aussi un rôle crucial dans le bon déroulement de la spermatogenèse, la « nutrition » des cellules germinales et dans la production d'hormones.

Présentes sur toute la hauteur de l'épithélium, elles établissent des jonctions serrées entre elles, ce qui permet de définir deux compartiments à l'intérieur du tube séminifère : un compartiment basal vers la lamina propria et un compartiment ad-luminal vers la lumière. Les cellules de Sertoli « englobent » aussi les cellules germinales, elles sont impliquées dans le contrôle de leur passage d'un compartiment à un autre, dans leur prolifération et leur métabolisme.

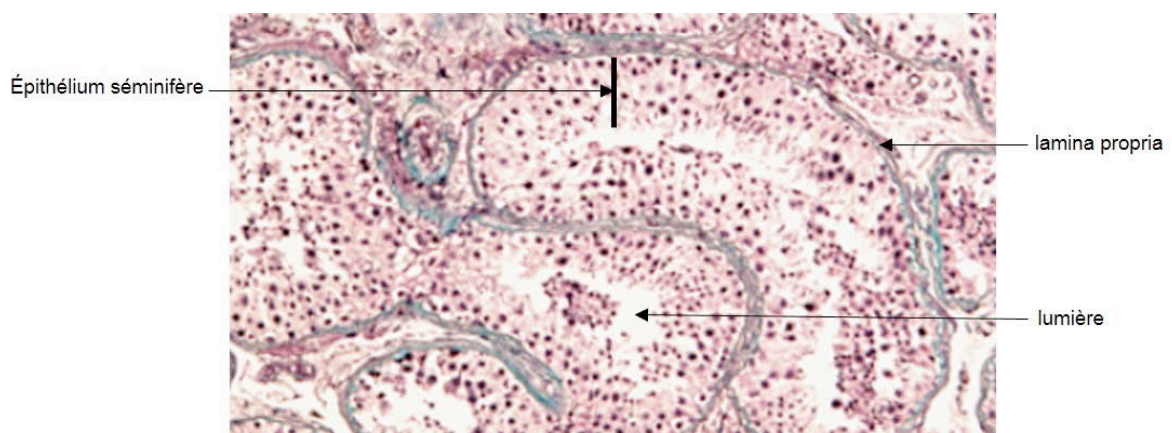


Figure 3 : Coupe d'épithélium séminifère à faible grossissement montrant une spermatogenèse normale. D'après *Robin et al. 2010*.

2. Déroulement de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un phénomène qui débute à la puberté chez l'homme et qui se poursuit physiologiquement de façon continue jusqu'à la mort. Ainsi à partir de cellules rondes diploïdes, les spermatogonies, il y aura production de cellules allongées, les spermatozoïdes (Figure 4) (Clermont 1963 ; pour revue voir Dadoune et al. 2001). La spermatogenèse a une durée évaluée chez l'homme à 74 jours. Elle comprend plusieurs phases que nous détaillons ci-après.

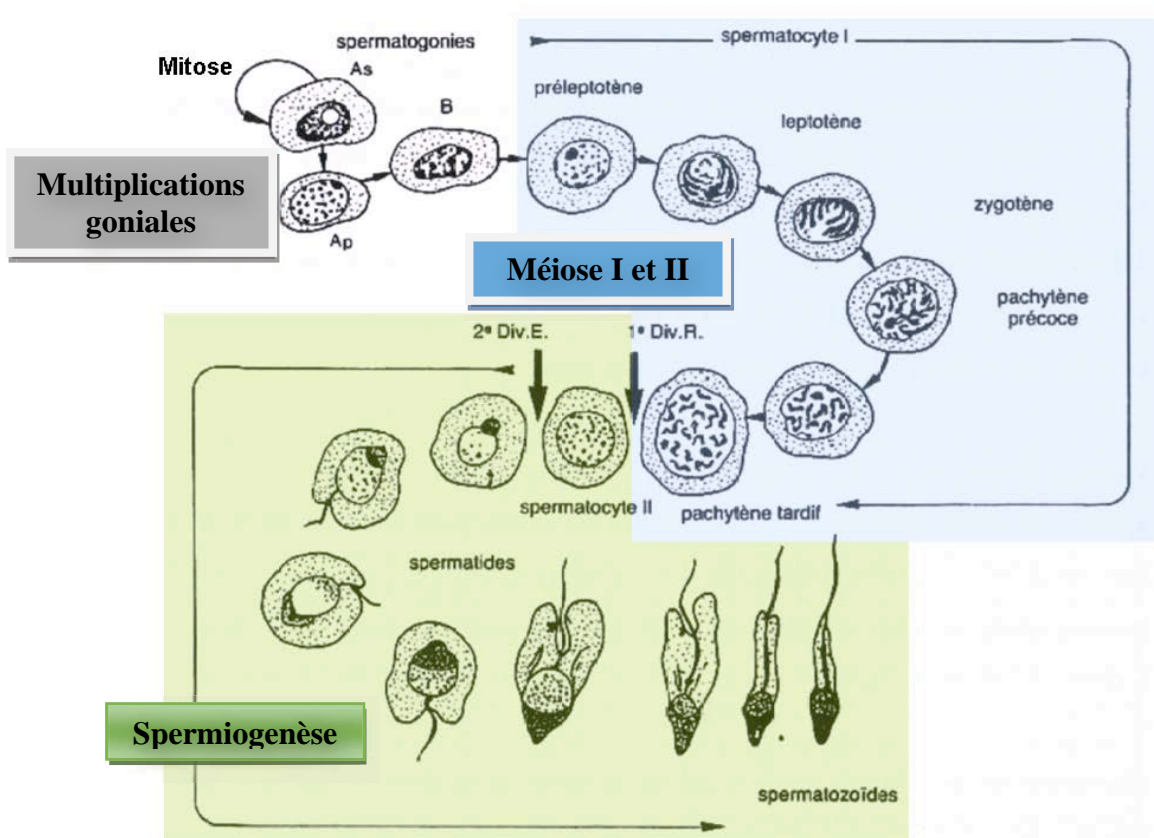


Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermatogenèse. D'après *Dadoune et al. 2001*.

a. Les mitoses goniales

Tout commence par les spermatogonies. Il existe plusieurs types de spermatogonies qui ont été décrites à l'origine en microscopie photonique et électronique, en fonction du caractère colorable et dense aux électrons (sombre) ou non (pâle) de leur noyau. Ces spermatogonies sont situées à la périphérie du tube séminifère contre la lamina propria (Figure 4) et vont se

multiplier par mitoses. Cette phase de multiplication goniale dure 27 jours.

Les spermatogonies Ad (d pour dark) ont une chromatine dense très colorable en microscopie optique et dense aux électrons en microscopie électronique. Elles ont la particularité d'être très en contact avec la lamina propria (angle de raccordement étroit, en d'autres termes ces spermatogonies sont aplaties sur la lamina propria). Elles se divisent par mitoses en 2 spermatogonies filles, l'une d'entre elle contribuera à renouveler le stock de cellules souches et l'autre se divisera en 2 spermatogonies Ap (p pour pale, à chromatine poussiéreuse, claire). Cette spermatogonie Ap a un angle de raccordement à la membrane plus élevé que la spermatogonie Ad. Ces spermatogonies Ap sont capables de se diviser, là aussi par mitoses, en spermatogonies B (dont la chromatine est mottée, irrégulière). Les spermatogonies B ont une activité transcriptionnelle intense. Durant l'interphase, au stade pré-leptotène, elles entrent dans une phase rapide de réplication de l'ADN puis elles se diviseront par mitoses en spermatocytes primaires (spermatocytes I).

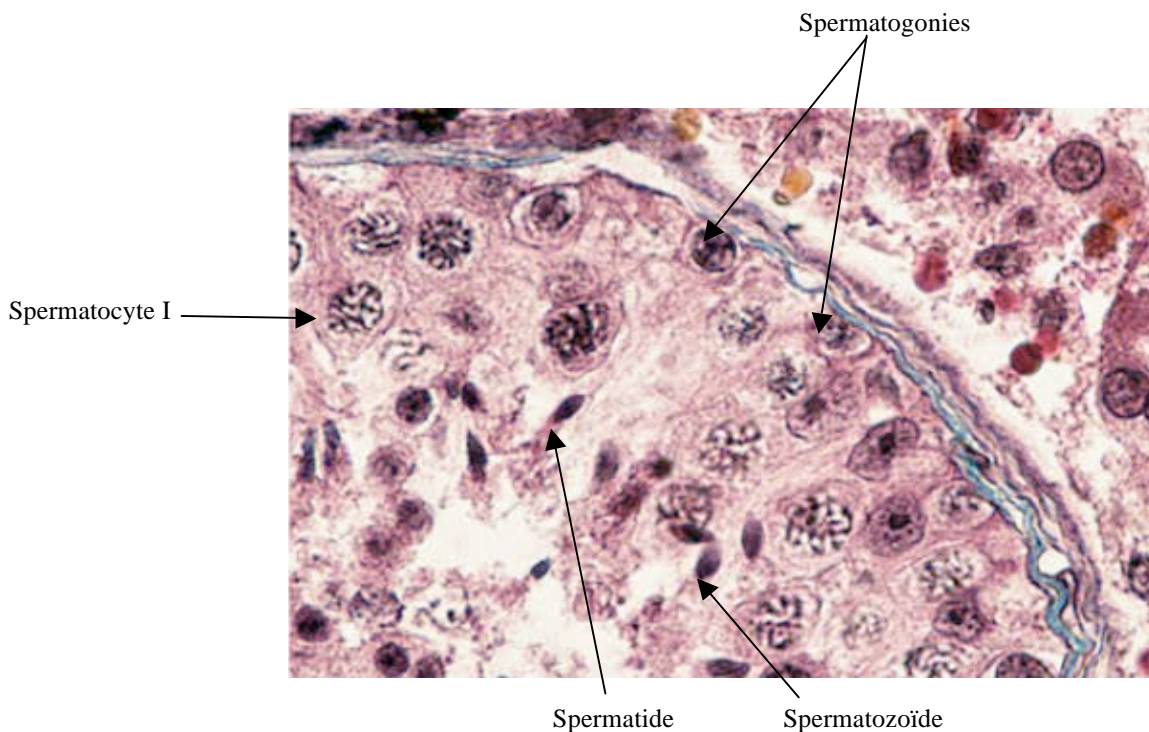


Figure 5 : Coupe d'épithélium séminifère à fort grossissement montrant une spermatogenèse normale. D'après Robin et al. 2010.

b. La méiose

Débutent alors, la méiose qui comprend deux divisions et qui a une durée de 24 jours. Les **spermatocytes primaires** (grandes cellules au noyau arrondi contenant plusieurs nucléoles) issus de la division des spermatogonies B progressent vers le compartiment ad-luminal de l'épithélium séminifère. Ces spermatocytes primaires vont entrer en méiose et subir une première division méiotique, la méiose I dite réductionnelle. Cette division débute par une prophase I longue, au cours de laquelle il y aura d'abord appariement des chromosomes homologues puis échange de matériel génétique entre les chromatides homologues par crossing-over au stade pachytène. En métaphase I, les chromosomes homologues se disposent de part et d'autre de la plaque équatoriale et restent attachés au niveau des chiasmas. En anaphase I, les chromosomes homologues migrent à l'opposé vers les pôles. À l'issue de cette première division de méiose, le spermatocyte primaire se divise en 2 spermatocytes secondaires (cellules plus petites à noyau arrondi) qui rentreront dans une deuxième division méiotique dite équationnelle: la méiose II.

Après une interphase courte et sans synthèse d'ADN préalable, les **spermatocytes secondaires** rentrent en méiose II. La méiose II est une phase beaucoup plus courte que la méiose I (essentiellement par réduction de la durée de la prophase). Durant la métaphase II, les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale et durant l'anaphase II, les chromatides sœurs se séparent aléatoirement vers chacun des pôles de la cellule. La cytodivision qui s'en suit conduit à la formation de deux **spermatides**.

Au total, ce mécanisme de division spécifique à la lignée germinale garantit le brassage de l'information génétique et l'élaboration de gamètes haploïdes à n chromosomes à une chromatide à partir de cellules à $2n$ chromosomes à 2 chromatides.

c. La spermiogenèse

La spermatogenèse n'est pas terminée puisqu'à partir de ce moment là va débiter une phase de différenciation de la spermatide ronde en **spermatozoïde**. C'est la phase finale de la spermatogenèse qu'on appelle la spermiogenèse. Cette phase dure 23 jours.

Au cours de la spermiogenèse, d'importants remaniements morphologiques se produisent. Certains qualifient même ces remaniements de « métamorphose ». Il y aura notamment mise en place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi, élongation du noyau et condensation

de sa chromatine, mise en place du flagelle, élimination du cytoplasme en excès et regroupement des mitochondries dans la pièce intermédiaire. Ce spermatozoïde qui est une cellule allongée hautement différenciée se détachera de l'épithélium séminifère (pour gagner la lumière) par un mécanisme de spermiation dans lequel, rentrent à nouveau en jeu les cellules de Sertoli.

d. Le cycle de l'épithélium séminifère et régulation de la spermatogenèse

Au total, la spermatogenèse est dite centripète car les cellules les plus immatures sont contre la paroi et que les spermatozoïdes sont détachés pour atteindre la lumière centrale. Elle a une durée de 74 jours. Pour permettre une production de spermatozoïdes continue, il y a en permanence des cellules souches qui débute le cycle spermatogénétique. De plus, chaque cellule souche est « programmée » pour entrer en division tous les 16 jours chez l'homme. Les cellules d'une même génération maintiennent des ponts entre elles. Certaines associations de cellules sont plus fréquentes que d'autres et 6 ont été décrites ; avec par exemple pour la plus fréquente l'association spermatogonie Ad, Ap, spermatocyte I au stade pachytène, spermatides Sa et Sd1 que nous détaillerons dans le chapitre suivant (Clermont 1963).

La spermatogenèse est sous contrôle de multiples facteurs, notamment hormonaux et apoptotiques. La mort cellulaire programmée (apoptose) est en effet d'une importance primordiale dans le bon déroulement de la spermatogenèse normale, pour éliminer les cellules germinales anormales (porteuses d'anomalies génétiques par exemple). Les stimuli pro apoptotiques peuvent être physiologiques mais aussi retrouvés en pathologie lors de l'exposition à la chaleur, aux toxiques...Mais avant d'aller plus loin revenons sur cette étape primordiale qu'est la spermiogenèse.

II. Focus sur la spermiogenèse

La spermiogenèse est une étape primordiale pour le futur spermatozoïde puisqu'à cette étape ses principales fonctionnalités se mettent en place. Classiquement, les spermatides ont été classées en 6 types qui correspondent à 6 phases successives où se mettent en place différentes structures : les spermatides Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1 et Sd2 (Figure 6 et 7).

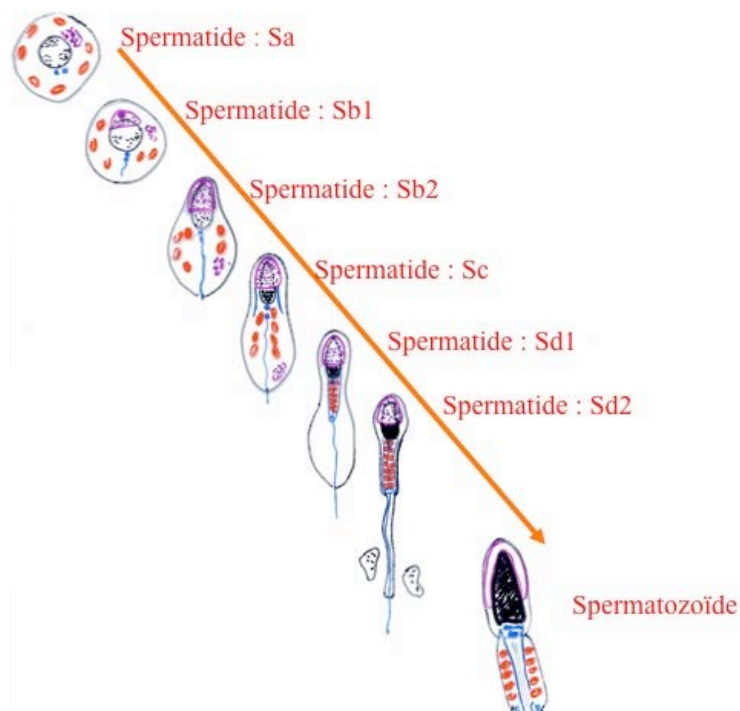


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermiogenèse. Dessin de M. Albert.

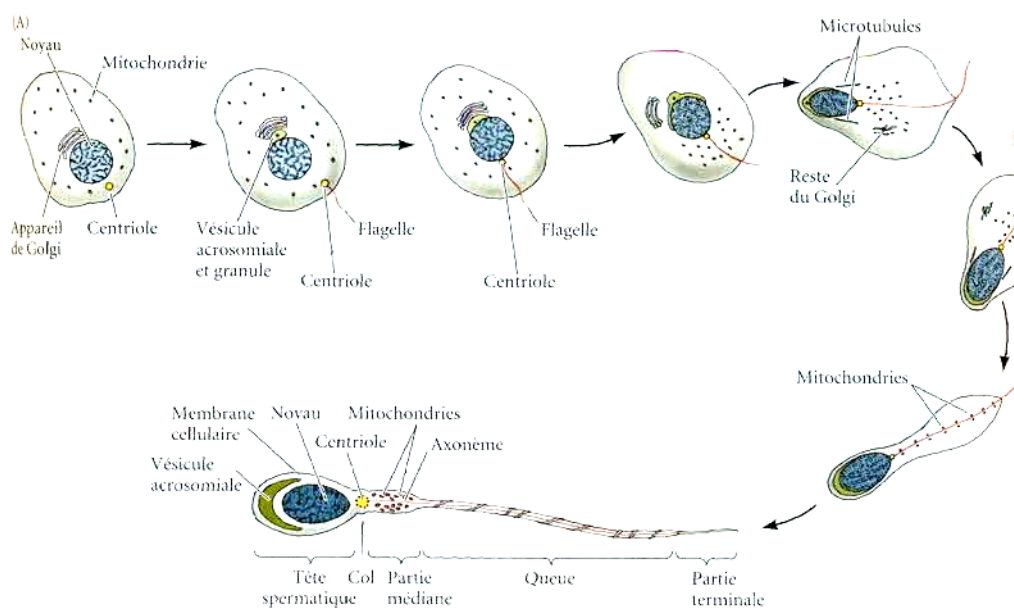


Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes de la spermiogenèse. D'après *Gilbert 2004*. Les spermatides Sa et Sb1 sont des cellules rondes. Dans la spermatide Sa, une petite zone

ronde PAS (acide périodique Schiff) positive est présente (en violet sur la figure 6). Dans la spermatide Sb1, le noyau commence à se condenser et la zone PAS positive commence à coiffer le noyau. Au stade de la spermatide Sb2, le noyau commence à s'allonger, le chapeau PAS positif s'allonge aussi pour couvrir les 2/3 antérieurs du noyau, c'est le futur acrosome. Au pôle opposé à cette ébauche acrosomiale, un filament intra-cytoplasmique se met en place, c'est le futur flagelle. De part et d'autre du flagelle, deux filaments constituent la manchette. Dans les spermatides Sc, la condensation du noyau et son allongement se poursuivent. La manchette s'est allongée aussi et est à son développement maximal. Au stade d1, le noyau a sa forme définitive, sa chromatine est bien condensée et le flagelle est en place. Les mitochondries se sont réorganisées et s'alignent le long de la partie initiale du flagelle (future pièce intermédiaire). Finalement au stade d2, la spermatide a une structure proche du spermatozoïde. La majorité du cytoplasme en excès a été éliminée.

Mais que se passe-t-il à l'échelle de la protéine durant la spermiogenèse ?

C'est en réalité une somme d'événements de différenciation très complexes qui vont permettre la mise en place de l'acrosome, du noyau (élongation et condensation) et du flagelle ainsi que la réorganisation des mitochondries ou encore l'élimination du cytoplasme.

1. Mise en place de l'acrosome

L'acrosome est d'origine Golgienne. Dans la spermatide ronde, l'appareil de Golgi est très développé. Dans sa concavité centrale, apparaissent des vésicules dites « pro-acrosomiques » qui vont fusionner pour former le futur acrosome qui va « se coller » au noyau puis « s'étaler » sur ce noyau, au fur et à mesure que les vésicules viennent enrichir la taille de ce futur acrosome.

On voit d'ores et déjà à cette étape que la mise en place de l'acrosome et l'allongement du noyau sont des mécanismes intimement liés.

2. Elongation du noyau et condensation de la chromatine

Durant la spermiogenèse le noyau spermatique va s'allonger et se condenser. Si cette condensation a été observée il y a déjà plusieurs années en microscopie optique et électronique, ce n'est que depuis quelques années que les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette condensation commencent à être élucidés. L'enjeu majeur était de comprendre

comment un si petit noyau spermatique pouvait contenir, véhiculer et protéger autant d'informations génétiques bien sûr mais aussi épigénétiques, on va le voir. C'est grâce à un phénomène de condensation de la chromatine spermatique, qui permet de compacter le noyau jusqu'à 6-10 fois plus que le noyau d'une cellule somatique.

Pour ce faire, la quasi-totalité des histones vont être enlevées pour être remplacées par des protéines de transitions puis par des protamines (Figure 8) (pour revue, voir Oliva et de Mateo 2010).

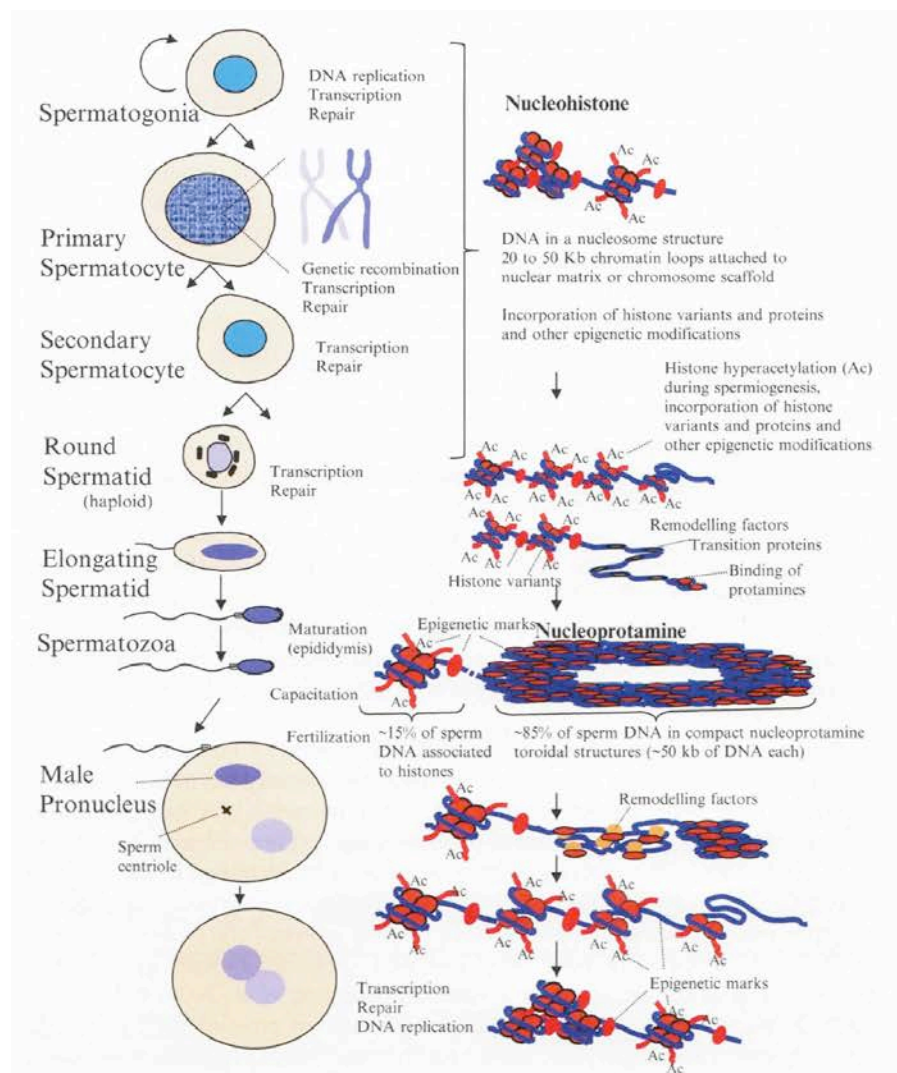


Figure 8 : Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la condensation de la chromatine du spermatozoïde humain. D'après *Oliva et de Mateo 2010*.

En effet, dans une cellule somatique, la chromatine est organisée en une structure nucléosomale, dont l'unité de base est le nucléosome au sein duquel l'ADN est enroulé autour d'un octamère d'histones formé des protéines histones, H2A, H2B, H3 et H4. Au cours de la spermatogenèse, on sait aujourd'hui qu'il y aura au départ un phénomène d'incorporation de variants d'histone.

Les variants d'histone sont des protéines homologues aux histones mais avec des propriétés spécifiques. Si on prend l'exemple de sTH2B (variant humain testiculaire sperme spécifique de l'histone H2B) qui est retrouvé au pôle basal de certains spermatozoïdes matures (30% des spermatozoïdes), il a été montré que la décondensation du noyau spermatique après la fécondation se faisait plus rapidement dans les spermatozoïdes porteurs de sTH2b. Ceci laisse supposer que sTH2B pourrait avoir un rôle dans l'activation des gènes paternels au cours du développement embryonnaire (Zalensky et al. 2002 ; Singleton et al. 2007).

Et puis il va y avoir une vague d'hyperacétylation des histones. Cette hyperacétylation va induire un relâchement de la chromatine, ce qui facilitera le remplacement des histones par des protéines de transition puis par les protamines. A cette étape, Brdt qui possède 2 bromodomains et est capable de se lier aux histones acétylées va jouer un rôle clé dans le remplacement des histones par les protamines et dans la poursuite de la spermiogenèse.

Il y aura aussi des modifications post-traductionnelles des histones, à type de méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination notamment. Ces modifications seraient impliquées dans le remplacement des histones par les protamines et donc dans le degré de condensation de la chromatine spermatique. Dans un *Nature* de 2007, l'équipe d'Okada a montré qu'une déméthylase qui déméthyle la lysine 9 de l'histone H3 (et le fait passer d'un statut diméthylé à un statut monométhylé) était indispensable à la condensation de la chromatine chez la souris. En effet, son action serait de déméthyliser des régions qui doivent être transcriptionnellement actives comme les promoteurs des protéines de transition ou des protamines. On peut donc émettre l'hypothèse que tel ou tel type de modification post-traductionnelle de telle ou telle histone pourrait potentiellement être impliqué dans le degré de condensation de la chromatine spermatique chez l'homme.

Ensuite, et là on dépasse un peu du cadre de la spermiogenèse, les protamines seront phosphorylées, il y aura formation de ponts disulfure entre les protamines durant la phase de maturation épидидymaire pour permettre une augmentation de la condensation de la chromatine spermatique. Les protamines riche en arginine s'associent à l'ADN par des liaisons hydrogène et des forces électrostatiques pour aboutir à une structure toroïdale ou en beignet (Figure 9) correspondant à un degré important de condensation chromatinienne.

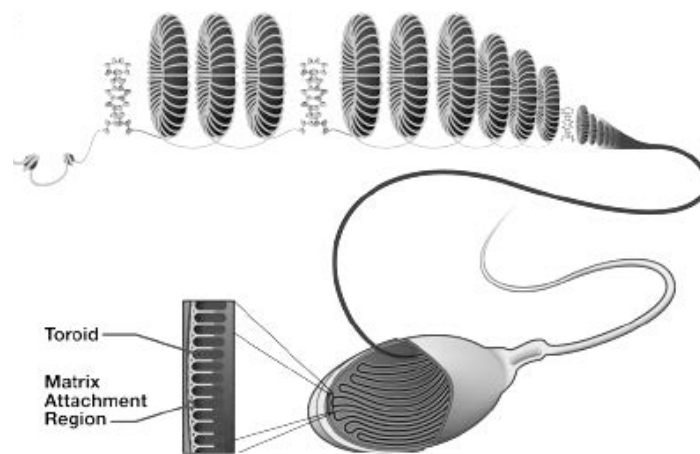


Figure 9 : Structure toroïdale de la chromatine du spermatozoïde humain. D'après *Carrell 2012*.

Au final, chez l'homme, on estime qu'environ 15% de l'ADN reste associé (de façon classique) aux histones alors que 85% de l'ADN se lie à des protamines (Gusse et al. 1986 ; Gatewood et al. 1990; pour revue voir Oliva et de Mateo 2010). La chromatine est donc le support d'informations épigénétiques (informations non codées par la séquence d'ADN) par le biais des variants d'histones, des modifications de ces histones et on peut donc dire que la condensation de la chromatine est porteuse d'une information épigénétique.

3. Mise en place du flagelle

Le futur flagelle avec sa structure axonémale (9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central), que nous ne détaillerons pas, se met en place à partir du centriole distal, au pôle opposé au futur acrosome.

Au cours de la spermiogenèse, il y aura aussi une réorganisation des mitochondries et regroupement en hélice autour de la partie supérieure du flagelle, la future pièce intermédiaire. Finalement le cytoplasme en excès sera éliminé. Ces différents remaniements morphologiques et fonctionnels aboutiront à la production de cellules effilées, hautement différenciées qu'on appelle les spermatozoïdes.

III. Structure du spermatozoïde humain

Le spermatozoïde humain est constitué d'une tête et d'un flagelle constitué d'une pièce intermédiaire, d'une pièce principale et d'une pièce terminale (figure 10).

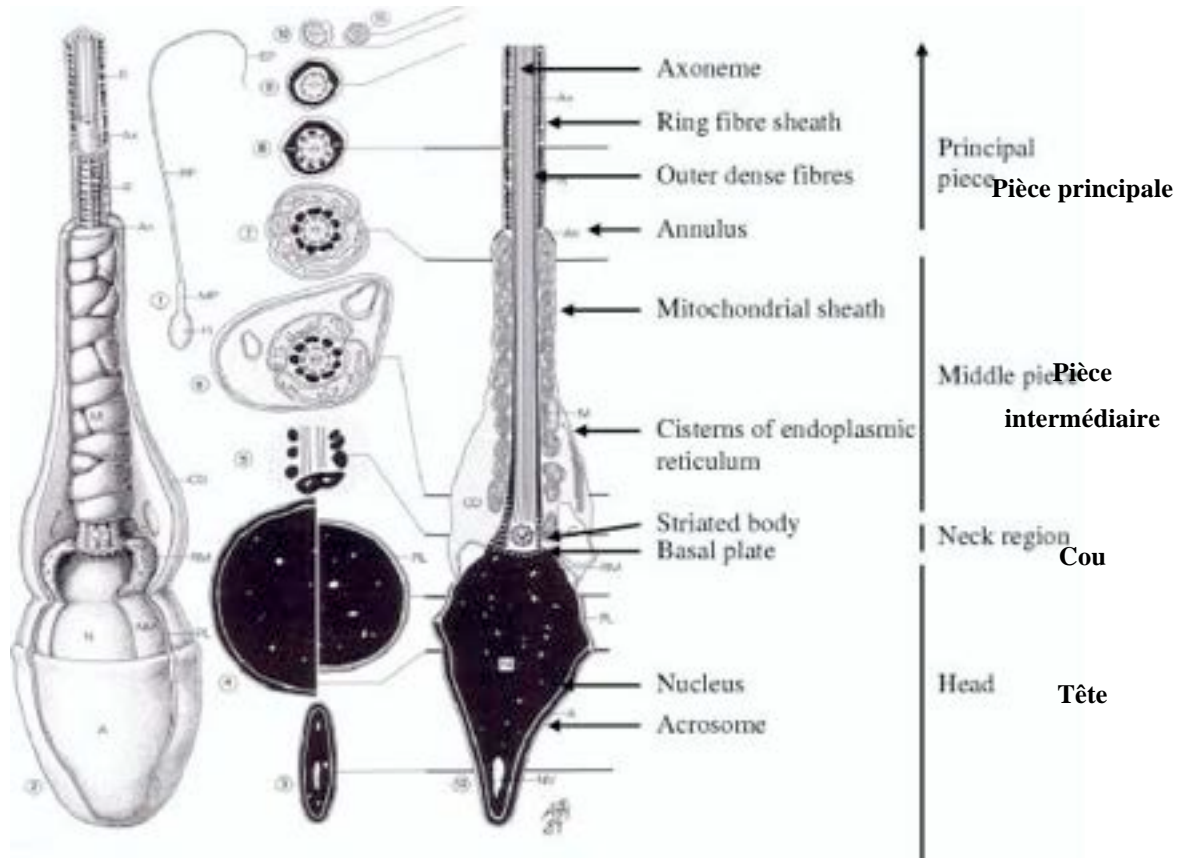


Figure 10 : Représentation schématique d'un spermatozoïde humain. D'après *Holstein et Roosen-Runge 1981*.

1. La tête

Physiologiquement, elle contient un noyau effilé en avant, un acrosome et très peu de cytoplasme. Le noyau est très épais en arrière, aplati en avant, de telle façon qu'il prend la forme d'un museau en avant ou encore d'une flamme de bougie quand on observe le spermatozoïde de profil. La partie antérieure (les 2/3 antérieurs) du noyau est coiffée par l'acrosome. D'après G. David, la tête du spermatozoïde a « *un contour très régulier ovalaire avec un grand axe de 5 μ m et un petit axe de 3 μ m environ (...)* L'acrosome doit couvrir 40 à 70% de la surface de la tête, avoir un contour régulier et une structure homogène » (Auger et al. 2001).

Le noyau du spermatozoïde est bien entendu porteur de « l'information génétique » et de la moitié du patrimoine génétique du futur zygote. Ce noyau présente donc physiologiquement une chromatine bien condensée, compactée qui permet de protéger l'équipement chromosomique du spermatozoïde lors de son long parcours jusqu'à l'ovocyte. Cette condensation est aussi un moyen de protéger l'ADN des dommages qu'il pourrait subir et le moyen de véhiculer une « information épigénétique ». Ces deux points seront (re)développés ultérieurement.

L'acrosome quant à lui, cette coiffe remplie d'enzymes aura un rôle bien entendu en physiologie lors de la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. Nous reviendrons sur l'intérêt de l'étude de cette fonction acrosomique dans le chapitre suivant.

2. Le flagelle

Toujours d'après G. David, la pièce intermédiaire « *mesure 1,5 à 2 fois la longueur de la tête, a un diamètre de 0,6 à 0,8 μm et son grand axe est dans le prolongement du grand axe de la tête. A son niveau un reste cytoplasmique de taille minime n'est pas considéré comme anormal* » (Auger et al. 2001). Elle est constituée d'une gaine de mitochondries regroupées sous forme d'anneau autour de l'axonème flagellaire. Ces mitochondries sont nécessaires à la production d'énergie pour les mouvements du flagelle.

Le reste du flagelle « *mesure environ 45 μm* ». Il comprend une pièce principale constituée d'une gaine de fibres denses externes disposées autour de l'axonème et une pièce terminale contenant l'axonème. La structure du flagelle, telle qu'elle a pu être décrite en microscopie électronique ne sera pas détaillée ici. Cette structure flagellaire permet au spermatozoïde d'assurer sa fonction première, à savoir la mobilité.

IV. Fonctions du spermatozoïde humain

1. Rôles dans la fécondation

La fécondation humaine implique une succession d'étapes palières aboutissant à l'activation de l'ovocyte et à l'initiation de l'embryogenèse. Le chemin jusqu'à l'ovocyte est long et semé d'embûches. Physiologiquement, il s'impose aux spermatozoïdes, d'être mobiles et fécondants. Au terme d'un parcours de près de 3000 fois leur taille, les spermatozoïdes,

ayant franchi le col et le maillage du mucus cervical puis escaladé les voies génitales féminines, atteignent finalement le sommet des trompes de Fallope et gagnent l'ampoule tubaire. Le spermatozoïde, capable, doit pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire, reconnaître et se lier à la zone pellucide de l'ovocyte, réaliser sa réaction acrosomique et forer la zone pellucide. Parvenu dans l'espace périvitellin, il s'arrimera à la membrane plasmique ovocytaire. Les membranes spermatique et ovocytaire fusionneront et le « contenu » du spermatozoïde s'intégrera alors au cytoplasme ovocytaire. L'ADN très condensé contenu dans la tête spermatique devra être décondensé pour former le pronucleus mâle. Ainsi, le spermatozoïde élu aura franchi de nombreux obstacles pour apporter au but, ce qu'il aura jusqu'alors protégé, la moitié du patrimoine génétique du futur zygote.

2. Rôles dans le développement embryonnaire

De plus, comme nous l'évoquions dans l'introduction, le spermatozoïde ne peut pas (plus) être considéré comme un simple transporteur d'ADN paternel. Le spermatozoïde est aussi vecteur d'une information épigénétique qui a un rôle très important dans le développement embryonnaire. Cette notion d'épigénome spermatique est une donnée relativement nouvelle. L'épigénétique a été définie il y a plusieurs années (en 1957) par Conrad Waddington comme l'étude des relations entre génotype et phénotype. Aujourd'hui elle s'envisage plus précisément comme l'étude des changements héréditaires (par mitose ou méiose) et réversibles modifiant l'expression des gènes et n'impliquant pas de changement de la séquence d'ADN (Riggs et al. 1996). Il existe plusieurs supports à cette information épigénétique spermatique (pour revue voir Carrell 2012 et Boissonnas et al. 2013) et notamment :

- **le remodelage de la chromatine** avec le remplacement de la majorité des histones par les protamines et les modifications biochimiques post-traductionnelles des extrémités amino-terminales libres des histones persistants.
- **la méthylation globale de l'ADN spermatique.**
- **la présence de petits ARN dans le sperme** (Ostermeier et al. 2002 ; pour revue voir Boissonnas et al. 2013).

Ces principaux supports de l'information épigénétique du spermatozoïde sont schématisés dans la figure 11.

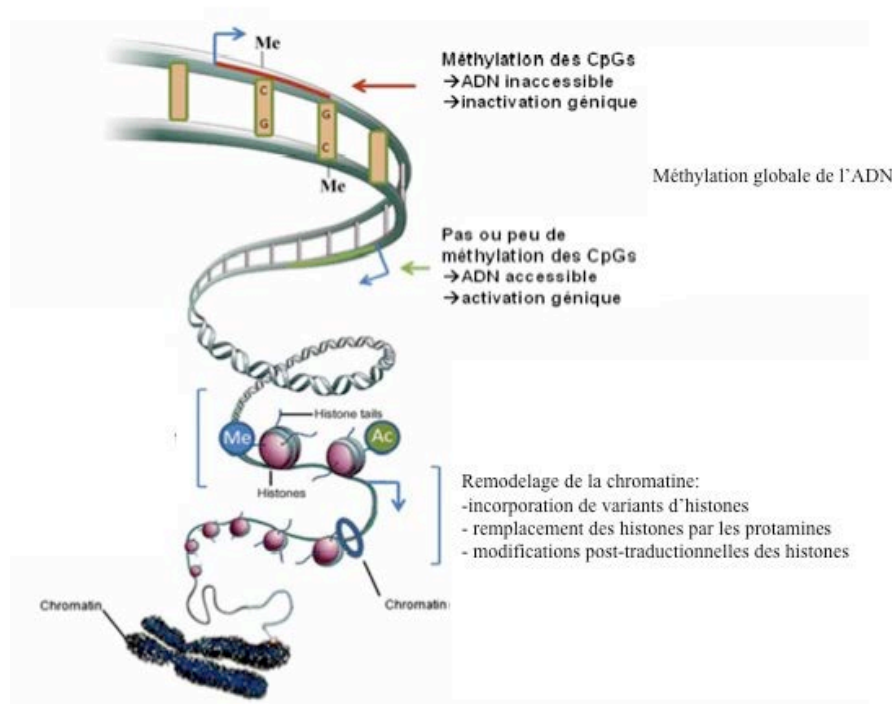


Figure 11: Les supports de l'épigénome spermatique. D'après *Rajender et al. 2011*

Ces informations épigénétiques sont liées et jouent des rôles importants dans le développement embryonnaire. Il a par exemple été montré que les histones « retenues » ou « persistantes » dans le noyau spermatique n'étaient pas distribuées au hasard mais étaient en fait maintenues sur des zones bien particulières du génome, au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Hammoud et al. 2011). Le spermatozoïde pourrait donc avoir un rôle à jouer sur le développement embryonnaire précoce et tardif (pour revue voir Hamatani 2012). De même pour ce qui concerne les ARN, certains ARNm coderaient pour des protéines impliquées dans le développement embryonnaire (Ostermeier et al. 2002 ; Ainsworth 2005 ; pour revue voir Boissonnas et al. 2013). On admet donc aujourd'hui « qu'un sperme n'en vaut pas un autre » mais surtout « qu'un spermatozoïde n'en vaut pas un autre » et que les spermatozoïdes ne donnent pas les mêmes chances de grossesse ni les mêmes chances de bonne santé dans la descendance.

L'INFERTILITE MASCULINE

**définition de l'infertilité et exploration des anomalies
spermatiques sur spermatozoïde fixé et vivant**

Dans un premier temps, nous définirons l'infertilité masculine, aborderons ses principales étiologies et discuterons de ses principales prises en charge en AMP. Nous insisterons ensuite sur les moyens qui permettent aujourd'hui au biologiste d'étudier la morphologie et les fonctions du spermatozoïde humain fixé et vivant.

I. L'infertilité masculine

1. Définition de l'infertilité masculine

D'après une étude récente, avec 1,5 enfant par femme, le taux de fécondité des femmes Européennes en âge de procréer tiendrait la dernière place mondiale (ESHRE Capri Workshop Group 2010). Ceci dit, un faible taux de fécondité n'est pas synonyme d'infertilité. Le taux de fécondité est le rapport du nombre total d'enfants vivants à la naissance par le nombre moyen de femmes « fécondes » pour une année donnée. Un taux de fécondité en berne aurait des supports plus sociétaux (instabilité des relations de couples, travail des femmes avec report de l'âge du premier enfant, changement des systèmes de valeurs avec une place pour la femme au foyer avec enfants de moins en moins établie dans l'esprit des femmes et des hommes...) que médicaux et liés à une infertilité.

L'OMS définit l'infertilité d'un couple comme l'incapacité à obtenir une grossesse après 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés. Pour la Haute Autorité de Santé (HAS), un délai de deux ans est à respecter pour parler d'infertilité et ne pas surestimer la prévalence de l'infertilité ; la moitié des femmes devant en effet attendre la deuxième année pour concevoir. Pour d'autres auteurs (Gnoth et al. 2005 ; Evers 2002), l'infertilité se définirait après 1 an de rapport sexuels réguliers efficaces (avec éjaculation vaginale) et non protégés et un bilan d'infertilité devrait être entrepris après 6 mois de rapports sexuels réguliers, efficaces et non protégés sans grossesse (Gnoth et al. 2005).

Quoiqu'il en soit, en France, comme dans le monde, environ 15% des couples seraient infertiles (WHO 2010a ; Boivin et al. 2007 ; Louis et al. 2013). Une cause exclusivement féminine est retrouvée dans plus d'un tiers des cas. Une cause masculine exclusive est observée chez 1 couple sur 5. Dans 40% des cas, l'homme et la femme ont une responsabilité partagée dans cette infertilité du couple. De nombreuses infertilités restent cependant inexpliquées. Au total, l'homme serait impliqué dans près de la moitié des infertilités du couple (WHO 2010a ; Thonneau et al. 1991).

2. Moyens d'exploration de l'infertilité masculine

Chez l'homme, le bilan d'infertilité repose sur un interrogatoire minutieux, un examen clinique et la prescription d'examens paracliniques.

L'interrogatoire s'intéressera à l'origine ethnique, à la notion de consanguinité chez les parents ou dans le couple, aux antécédents chirurgicaux et médicaux notamment testiculaires et urinaires (antécédents de cryptorchidie, torsion testiculaire, hernie inguinale dans l'enfance, infections urinaires...), à la fertilité antérieure, au poids, à la taille, à la profession, au degré d'exposition à la chaleur des testicules, à la prise de traitements ou de toxiques (alcool, tabac, cannabis...), à la fertilité de la fratrie et des parents ou encore à la fréquence des rapports sexuels...

L'examen clinique est adapté et comprend au minimum une observation du corps à la recherche d'une gynécomastie, de signes d'hypogonadisme (pilosité insuffisante, longs cils par exemple). L'examen des organes génitaux externes (verge, testicules avec évaluation de la consistance puis des volumes à l'orchidomètre, palpation des canaux déférents, recherche d'une varicocèle notamment) est un examen primordial à réaliser en première intention.

Au terme de cette consultation, la prescription entre autres d'un spermogramme est réalisée. Ce spermogramme est l'examen de base d'exploration de la fertilité masculine. Tout résultat pathologique devra faire l'objet d'un contrôle avant d'envisager de prescrire d'autres examens. Bien entendu, d'autres examens peuvent être demandés en fonction de l'interrogatoire, de l'examen clinique, de la suspicion de telle ou telle pathologie et des résultats du premier spermogramme. Ainsi des dosages hormonaux (FSH, inhibine B, testostérone notamment), un caryotype lymphocytaire, le dosage de marqueurs séminaux, une échographie scrotale et du carrefour vésiculo-déférentiel, des explorations fonctionnelles spécialisées du sperme ou encore un bilan génétique approfondi mais orienté pourront être réalisés dans le bilan de l'infertilité de l'homme.

3. Principales étiologies d'infertilité masculine

Au terme de ce bilan, plusieurs étiologies d'infertilité masculines peuvent être retrouvées. Classiquement, on classe ces étiologies en 3 groupes : les atteintes pré-testiculaires (touchant l'étage hypothalamo-hypophysaire), les atteintes testiculaires (altération quantitative et/ou qualitative de la spermatogenèse de causes variées) et les atteintes post-testiculaires (altération de la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes, de leur transit,

de l'éjaculation). Ceci dit, 30 à 45% des infertilités masculines (diagnostiquées comme telles devant la normalité du bilan féminin et la présence d'une ou plusieurs altérations des paramètres spermatiques étudiés lors du spermogramme) demeurent idiopathiques (Jungwirth et al. 2012).

4. Prise en charge de l'infertilité masculine et du couple

Au terme du bilan d'infertilité du couple, une décision devra être prise sur la technique d'AMP à utiliser. Plusieurs techniques sont disponibles. Il existe l'induction simple de l'ovulation féminine, l'insémination intra-utérine avec sperme de conjoint ou de donneur, la fécondation in vitro classique avec sperme de conjoint ou de donneur, l'ICSI (intracytoplasmic sperm injection) et l'IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection). Le choix de la technique à utiliser pour un couple dépend de nombreux critères féminins (bilan de réserve ovarienne, présence ou non d'une perméabilité tubaire, présence d'endométriose ou encore d'un syndrome des ovaires polykystiques...) et masculins (présence ou non de spermatozoïdes dans l'éjaculat, leur numération, leur mobilité...), de la durée de l'infertilité, de l'âge, des contre-indications éventuelles à la ponction d'ovocyte, des résultats des tentatives antérieures

Hormis les inductions simples, les autres techniques utilisent toutes une préparation de spermatozoïdes migrés. Ces spermatozoïdes sélectionnés seront soit inséminés « in utéro », soit directement mis en contact avec l'ovocyte, soit micro-injectés. Comme cette thèse a pour but d'établir des liens entre la morphologie des spermatozoïdes et leurs marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, leur contenu chromosomique et leurs capacités fécondantes, ne seront détaillées ici que les techniques qui reposent sur une sélection du spermatozoïde, à savoir l'ICSI et l'IMSI.

a. La fécondation in vitro avec micro-injection du spermatozoïde (ICSI)

Il s'agit d'une fécondation in vitro avec micromanipulation du gamète mâle. Elle est généralement proposée quand les caractéristiques spermatiques, notamment en termes de numération, de mobilité et/ou de morphologie ne permettent pas de pratiquer une insémination intra utérine ni une fécondation in vitro classique (FIVc). Elle peut être utilisée aussi après échec de fécondation en FIVc, ou en cas d'utilisation de spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires en cas d'azoospermie (HAS 2006).

Après décoronisation des ovocytes et observation de la présence du premier globule polaire, les ovocytes matures (en métaphase II) seront injectés un à un avec un spermatozoïde pré-sélectionné au grossissement x200 ou x400, avec un microscope utilisant le contraste de Hoffman. Notons que les patients oligo-asthéo-tératospermiques (OAT) bénéficient généralement d'une ICSI. Chez ces patients, il est souvent réalisé une congélation de spermatozoïdes. En effet la congélation peut être utile en cas d'OAT sévère ou lorsqu'il existe un doute sur une éventuelle dégradation possible des caractéristiques spermatiques. La congélation de spermatozoïdes que nous détaillerons dans le chapitre « méthodes », est aussi utile pour la congélation des spermatozoïdes épididymaires et testiculaires (congélation antérieure au protocole d'hyperstimulation contrôlée de la patiente), en cas de stress et d'impossibilité de recueil le jour de la ponction d'ovocytes.

b. L'ICSI avec pré-sélection du spermatozoïde à fort grossissement (IMSI)

L'IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection) est une variante de la technique d'ICSI, utilisée aujourd'hui essentiellement en Europe. Les spermatozoïdes sont sélectionnés à l'aide d'un micromanipulateur (figure 12) à un fort grossissement variant de x 6300 à plus de x10000 avec un microscope utilisant le contraste interférentiel différentiel (DIC) de Nomarski. Le principe repose sur l'observation des spermatozoïdes à l'aide d'un rayon lumineux polarisé qui se divise en deux rayons. Parce que le plastique est dépolarisant, les spermatozoïdes sont observés dans une boîte en verre. Si les deux rayons suivent le même chemin optique, la polarisation initiale de la lumière est conservée et la structure apparaît non contrastée. A l'opposé, si la réflexion altère l'un des deux rayons, la lumière initiale se dépolarise. Ceci génère des régions d'intensité lumineuse différente discernables à l'œil. Ainsi, le contraste de Nomarski ne met pas seulement en évidence les anomalies des surfaces cellulaires mais peut également donner une idée de l'épaisseur de la structure. Cette méthode d'observation fine de la tête des spermatozoïdes permet de mettre en évidence des « vacuoles ». Notons toutefois que les « vacuoles » observées avec ce contraste, et notamment les plus grosses d'entre elles, peuvent aussi être observées en microscopie optique classique au grossissement x400.



Figure 12: Appareillage nécessaire à la réalisation du MSOME et de l'IMSI. *Photo de M. Albert.*

II. Les moyens d'étude de la morphologie et des fonctions du spermatozoïde humain fixé

Le spermogramme et le spermocytogramme sont des examens à réaliser en première intention dans le bilan d'infertilité masculine. D'autres examens spermatiques plus spécialisés seront décrits ci-après. En général, ces explorations spécialisées n'ont pas leur place en routine dans l'évaluation de l'homme infertile. Nous les détaillerons ici car nous les avons utilisées pour établir des liens entre la morphologie et les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain. Trois articles didactiques traitant de ces moyens d'études ont été écrits durant ces 3 années de thèse et sont référencés en annexe.

1. Le spermogramme: un examen de base

Il existe divers moyens d'étude du spermatozoïde humain. Certaines explorations font partie du bilan de base de l'homme infertile, il s'agit notamment du spermogramme qui évalue entre autres la numération, la mobilité et la vitalité spermatiques. Ce spermogramme de base s'accompagne d'une évaluation de la morphologie des spermatozoïdes fixés et colorés avec la coloration de Schorr ou de Papanicolaou, qu'on appelle le spermocytogramme. Le

spermogramme et le spermocytogramme sont des techniques rigoureusement encadrées par le manuel de l’OMS qui définit les moyens d’étude des paramètres spermatiques, les modes de réalisation, les résultats attendus et les normes ainsi que les coefficients de variations attendus pour chaque technique. Quand cette thèse a débuté en 2010, ce manuel de l’OMS a fait l’objet d’une révision complète (WHO 2010b); la version précédente datant de 1999. Depuis plusieurs décennies, les paramètres spermatiques des hommes ne cessent de s’altérer et les normes n’ont de cesse de diminuer. Nous avons publié 2 articles et communiqué sur la façon dont devaient être prises en compte ces nouvelles normes (**articles présentés en annexe**). Au total, les nouvelles normes OMS (2010) ainsi que les pathologies spermatiques déduites de ces normes sont résumées dans le tableau ci-dessous.

PARAMÈTRES	NORMES OMS 2009	VALEURS ANORMALES	PATHOLOGIE
Volume	≥ 1,5 ml et <6ml	0 ml < 1,5 ml > 6 ml	ASPERMIE HYOSPERMIE HYSPERMIE
Ph	7,2 à 8	↑ ↓	
Viscosité	Liquéfaction en 30mn à 37°C	↑ ↓	
Numération des spz	≥ 15 M/ml ≥ 39 M/éjac	> 200 M/ml < 15 M/ml < 5 M/ml < 1 M/ml Absence de spz au direct qqs spz après cg Absence de spz après cg	POLYZOOSPERMIE OLIGOZOOSPERMIE OLIGOZOOSPERMIE SÉVÈRE OLIGOZOOSPERMIE EXTRÊME CRYPTOZOOSPERMIE AZOOSPERMIE
Mobilité à 1h Mobilité à 4h	≥ 40 % de a+b+c ≥ 32% de a+b	a+b+c<40% et/ou a+b<32% ↓ mobilité >50% à H4	ASTHÉNOZOOSPERMIE ASTHÉNOZOOSPERMIE II'
Vitalité	≥ 58 %	< 58 %	NÉCROZOOSPERMIE
Leucocytes	< 1 M/ml	≥ 1 M/ ml	LEUCOSPERMIE
Agglutinats	Absence	Présence	
Formes typiques			TÉRATOZOOSPERMIE
Autres	Absence de sang	Présence de sang	HÉMOSPERMIE

Tableau 1 : Les seuils de normalité des différents paramètres spermatiques (en orange figurent les seuils ayant changé dans la 5^{ème} édition du manuel de l’OMS) et les pathologies spermatiques qui y sont associés. D’après **WHO 2010b**.

a. Le spermocytogramme

Des frottis de spermes fixés et colorés (coloration de Harris Schorr ou de Papanicolaou) vont permettre la lecture ultérieure de la morphologie spermatique lors du spermocytogramme. Le spermocytogramme analyse **la morphologie spermatique**. Le spermologiste doit la définition en microscopie optique, d’un spermatozoïde normal aux équipes de David (1975) puis de Kruger (1986) qui sont les pères des deux classifications

utilisées aujourd'hui pour l'évaluation de la tératozoospermie. La classification de David a été modifiée en 2000 (Auger et al. 2001) et demeure aujourd'hui un outil diagnostique clé de l'infertilité masculine puisqu'elle permet de définir la tératozoospermie, c'est à dire d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes typiques et atypiques d'un sperme et de décrire le type et le nombre d'anomalies portées par chaque spermatozoïde (index d'anomalies multiples ou IAM). La classification de David modifiée évalue les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

Ont été décrites :

- 7 anomalies de la tête : allongée, amincie, microcéphales, macrocéphale, multiple, anomalie de la région acrosomique, anomalies de la base.
- 3 anomalies de la pièce intermédiaire : reste cytoplasmique, pièce intermédiaire grêle, pièce intermédiaire angulée et
- 5 anomalies de la pièce principale c'est à dire du flagelle: absent, écourté, de calibre irrégulier, enroulé et multiple.

La norme est placée à 30% de spermatozoïdes typiques. Dans notre laboratoire, nous sommes restés fidèles à la classification de David et au principe de l'IAM tout en appliquant une lecture plus sévère des anomalies. De ce fait, notre norme de pourcentage de formes typiques est de 15%. Mais d'après le dernier manuel de l'OMS, la tératozoospermie est définie comme un pourcentage de spermatozoïdes typiques inférieur à 4%. L'utilisation de cette norme n'est pas encore intégrée en routine dans notre laboratoire. Si en général les anomalies morphologiques sont variables pour un sperme donné, il existe des cas, nous le reverrons, où une anomalie va se retrouver de façon homogène sur l'ensemble des spermatozoïdes.

b. La microscopie électronique

Le principe de la microscopie électronique en transmission (MET) a été découvert en 1931. La MET repose sur l'illumination de la préparation par un système de filaments en tungstène qui permet d'émettre des électrons, quand il est chauffé à haute température (canon à électrons). Un système de lentilles magnétiques permet de focaliser le faisceau d'électrons sur une coupe ultrafine (50 à 70 nm) préparée précédemment. La MET permet ainsi un grossissement de 1000 à 50000 fois avec une résolution est de 0,2 nm. En MET, on peut donc observer l'ultra-structure des spermatozoïdes et voir les détails du noyau, de l'axonème ou encore les membranes. Cette technique nécessite un savoir-faire important et

une préparation méticuleuse des échantillons avec différentes étapes comme la fixation, la déshydratation et l'inclusion en résine avant coupes ultrafines de l'échantillon. Cette technique a été tout particulièrement utilisée pour décrire les anomalies ultrastructurales de l'axonème du flagelle ou des structures péri-axonémales, telles qu'on les rencontre dans les dyskinésies flagellaires. Elle permet aussi de voir les détails de la condensation chromatinienne nucléaire (figure 13). Les principaux défauts de cette technique sont d'une part la lourdeur technique et d'autre part la nécessité de fixation, inclusion et coupe du spermatozoïde contre-indiquant son utilisation ultérieure en AMP par exemple.

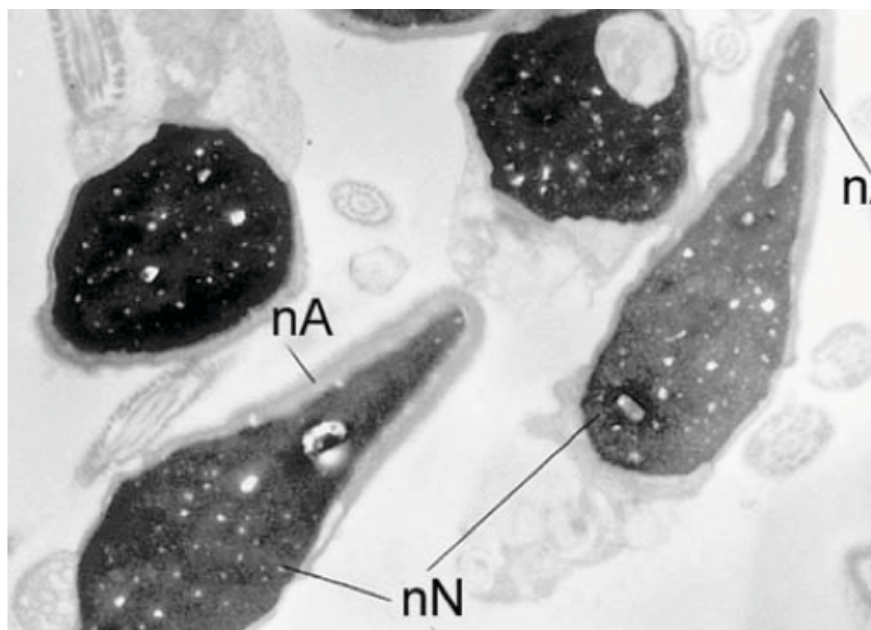


Figure 13 : Diverses morphologies des têtes spermatisques telles qu'elles peuvent être observées en microscopie électronique. *Photos de M. Albert.*

3. Moyens d'étude du noyau des spermatozoïdes fixés

Pour évaluer le noyau du spermatozoïde, le biologiste dispose, on l'a vu, du spermogramme-spermocytogramme, auquel peuvent s'ajouter des tests dits fonctionnels, tests qui explorent, une à une chacune des étapes de la préparation du spermatozoïde à la fécondation, ainsi que leurs qualités intrinsèques. Les principaux tests disponibles sont résumés dans la figure ci-dessous (figure 14). La description de ces tests et une revue de la littérature ont abouti à un travail de synthèse publié sous la forme d'un chapitre de livre et à une communication orale sur le sujet (**article présenté en annexe**).

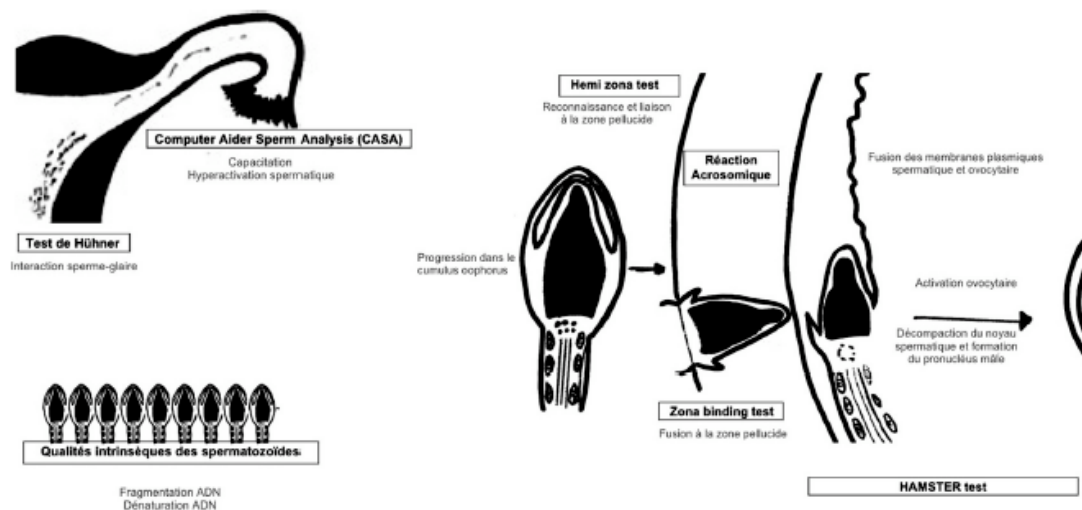


Figure 14 : Les principales explorations fonctionnelles spécialisées du sperme. D'après *Boitrelle et al. 2011* (article 13).

a. L'étude des marques épigénétiques spermatiques

Il existe, on l'a vu divers supports de l'information épigénétique spermatique. Nous nous focalisons ici sur le remodelage de la chromatine. La condensation de la chromatine spermatique est un processus épigénétique complexe impliquant le remplacement des histones par des protamines. Plusieurs tests directs ou indirects sont disponibles pour évaluer la condensation de la chromatine (pour revue, voir Oliva et de Mateo 2010): l'étude du degré de protamination par étude directe du contenu du noyau spermatique en protamines, étude indirecte via le test à la chromomycine A3 ou encore par étude du contenu en histones via la coloration au bleu d'aniline. Parmi eux, la coloration au bleu d'aniline présente l'avantage de sa simplicité. Le bleu d'aniline marque les histones car ils sont riches en lysine (Dadoune et al. 1988; Auger et al. 1990; Hammadeh et al. 2001), contrairement aux protamines riches en arginine. Dans un sperme normal, moins de 20% des spermatozoïdes présentent une chromatine mal condensée. Ce test au bleu d'aniline et son caractère prédictif des résultats en AMP a été analysé dans quelques études anciennes (Figure 15). Plus récemment dans deux études, il a été montré que chez les couples dont l'homme présentait de nombreux spermatozoïdes dont la chromatine était mal condensée (évaluation à l'aide de la coloration au bleu d'aniline), les fausses couches étaient plus fréquentes et les taux de grossesse plus faibles (Kazerooni et al. 2009 ; Talebi et al. 2012).

Table 3.4 Sperm protamine and histone assessment and assisted reproduction results

Method	Sample size according to ART	Threshold proposed	Fertilization rate affected?	Embryo quality affected?	Pregnancy affected?	Elevated miscarriages?	Authors
Direct protamine measurements through extraction, electrophoresis, and detection (P1/P2 ratio)	87 ICSI/26 IVF	< 1.1 and >1.5	Yes (IVF)	NS	Yes	NA	de Mateo et al. (2009)
	124 IVF/264 ICSI	< 0.8 and >1.2	Yes (IVF)	NS	Yes	NS	Aoki et al. (2006)
	71 IVF/73 ICSI	< 0.8 and >1.2	Yes (IVF+ICSI)	NS	NS	NS	Aoki et al. (2005a)
Indirect protamine determination through CMA3 staining	82 IVF/50 ICSI	29.25%	Yes (IVF)	NA	Yes (IVF)	NS	Tarozzi et al. (2009)
	92 IVF+ICSI	40%	Yes	Yes (IVF+ICSI)	NS	NA	Tavalaee et al. (2009)
	50 ICSI	—	Yes	NA	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2008a)
	68 ICSI	40%	Yes	NA	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2008b)
	26 IVF/22 ICSI	—	NA?	NA	NS	NA	Hammadeh et al. (2006)
	28 ICSI	—	Yes	NS	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2005)
	56 ICSI	30%	Yes	NA	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2004a)
	45 ICSI	30%	Yes	NS	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2004b)
	55 ICSI	30%	Yes	NA	NA	NA	Razavi et al. (2003)
	101 IVF	30%	Yes	NA	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2001)
	140 IVF	—	NS	NS	NS	NA	Tomlinson et al. (2001)
	32 IVF/38 ICSI	30%	NS	NA	NA	NA	Sakkas et al. (1996)
	130 ICSI	75%	NA	NA	Yes	NA	Wong et al. (2008)
	222 Natural conceptions	—	NA	NA	NS	NA	Jedrzejczak et al. (2008)
	55 ICSI	—	NS	NA	NA	NA	Razavi et al. (2003)
	101 IVF	20%	Yes	NA	NA	NA	Nasr-Esfahani et al. (2001)
	78 IVF	20%	Yes	NA	Yes	NA	Hammadeh et al. (1998)
	61 ICSI	29%	NS	NA	NS	NA	Hammadeh et al. (1996)
	89 II II	—	NA	NA	NS	NA	Milingos et al. (1996)
Indirect histone assessment through aniline blue staining					yes	yes	Kazerooni et al. 2009
					yes	yes	Talebi et al. 2012

Figure 15 : Les moyens d'étude de la condensation de la chromatine. *D'après Oliva et de Mateo 2010.*

En ce qui concerne maintenant l'étude des mécanismes impliqués dans le remplacement des histones par les protamines, certaines méthodes permettent d'analyser l'incorporation de variants d'histones. Par exemple, un marquage antigène/anticorps du variant testis spécifique de l'histone H2B (hTSH2B) est possible. Il a été montré que ce variant pouvait être retrouvé dans les spermatozoïdes matures (Singleton et al. 2007) et que la décondensation du noyau spermatique après la fécondation se faisait plus rapidement dans les spermatozoïdes porteurs de hTSH2b. Ceci laisse supposer que hTSH2B pourrait avoir un rôle dans l'activation des gènes paternels au cours du développement embryonnaire (Singleton et al. 2007). De plus, sa présence serait moins fréquente chez les patients présentant une oligoasthénotératozoospermie que chez les patients dont le sperme présente des caractéristiques normales (Ramos et al. 2008).

En ce qui concerne les modifications post-traductionnelles des histones persistants, on sait que les queues N-terminal peuvent être le siège de modifications biochimiques telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitynilation ou encore la sumoylation (pour revue Carrell 2012). La méthylation est la modification la plus fréquente (Rajender et al. 2011). Elle fait intervenir des histones méthyltransférases (HMTases). La position et le nombre de groupements méthyles permettent ainsi la transmission d'un signal épigénétique

particulier. Par exemple, chez l'humain, la mono-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9 me) est associée à la répression de l'expression génique ou « gene silencing » (figure 16). D'un autre côté, il a été montré, chez la souris, qu'une déméthylase qui déméthyle la lysine 9 de l'histone H3 et le fait passer d'un statut diméthylé à un statut monométhylé était indispensable à la condensation de la chromatine chez la souris en déméthylant des régions qui deviennent alors transcriptionnellement actives comme les promoteurs des protéines de transition ou des protamines (Okada 2007). Diverses méthodes d'exploration de ces modifications post-traductionnelles sont disponibles. Mais si on souhaite analyser ces modifications à l'échelle d'un spermatozoïde, seul le marquage antigène/anticorps d'une (ou éventuellement plusieurs) modification(s) est(sont) possible(s). Par exemple, nous avons dans l'équipe mis au point l'exploration de 2 marques épigénétiques (H3K9me/H3K9me2) sur les mêmes spermatozoïdes en choisissant des anticorps primaires (H3K9me et H3K9me2) vendus dans le commerce mais produits chez des animaux différents.

Summary of activating and silencing histone modifications relevant to sperm.			
Modification	Activating	Silencing	Bivalency
Acetylation of H3	X		
Acetylation of H4	X		
Ubiquitination of H2B	X		
H3K4me2	X		
H3K4me3	X		
Ubiquitination of H2A		X	
H3K9me		X	
H3K27me3		X	
H3K4me3 and H3K27me3			X

Figure 16 : Les principales modifications des histones à activité « gene silencing » ou « gene activating » chez l'humain. D'après *Carrell 2012*.

Finalement, la méthylation globale de l'ADN s'effectue au niveau des cytosines liées par une liaison phosphodiester à une guanine (dinucléotides CpGs). Les DNA méthyltransférases (DNMTs) ajoutent un groupement méthyle, provenant de S-adenosyl-méthionine, sur le carbone C5 du noyau pyrimidine du résidu cytosine (Hermann et al. 2004; Goll et Bestor 2005 ; Biermann et Steger 2007). Il existe plusieurs types de DNMTs qui peuvent entrer en jeu dans l'initiation ou le maintien de la méthylation. Les dinucléotides CpG présents en forte concentration au niveau des promoteurs des gènes sont appelés les îlots CpG et représentent d'importants inhibiteurs de la transcription quand ils sont méthylés (Portela et Esteller 2010 ; Thomson et al. 2010). Sans rentrer dans les détails,

la méthylation globale de l'ADN inhiberait l'expression des gènes soit par encombrement stérique, en empêchant la liaison de facteurs de transcription, soit par le biais du recrutement de protéines de liaison à l'ADN méthylé, qui induiraient la compaction de la chromatine et par conséquent son inactivation. Au total, l'hyperméthylation maintient l'inhibition transcriptionnelle, alors que l'hypométhylation autorise l'expression des gènes (Biermann et Steger 2007). Diverses méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence la méthylation globale de l'ADN spermatique. Mais si on veut connaître le degré de méthylation d'un spermatozoïde, seul un marquage Antigène/Anticorps à l'aide d'anticorps anti 5 méthyl cytosine (5mC) est possible. A l'échelle d'un spermatozoïde, l'étude de la méthylation de l'ADN nécessitera alors une parfaite maîtrise de méthodes de quantification de fluorescence appliquées à une cellule unique de petite taille.

b. L'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique

Une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes existe physiologiquement lors du remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse, et on observe alors des mécanismes de réparation spécifiques faisant intervenir une topoisomérase II. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer une fragmentation excessive de l'ADN des spermatozoïdes. Une activité excessive des topoisomérases II ou une déficience en inhibiteurs de topoisomérase peut induire une susceptibilité accrue de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés à la dénaturation, et une fragmentation de cet ADN (Morse-Gaudio et Risley 1994). De plus, un défaut qualitatif ou quantitatif du contenu en protamines (non condensation de la chromatine) peut être responsable d'une fragilisation de l'ADN spermatique (Carrell et Liu 2001; pour revue voir Oliva et de Mateo 2010). Une exposition à des doses supraphysiologiques de substances réactives de l'oxygène (ROS) est impliquée dans l'infertilité masculine et le stress oxydatif semble être une des causes majeures des dommages de l'ADN dans les cellules germinales mâles (Saleh et al. 2003; Aitken et al. 2003). Ainsi, en cas d'infection ou d'inflammation, la genèse de ROS s'accompagne d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN. Enfin, bien que pendant longtemps controversé, de multiples observations plaident en faveur d'un phénomène apoptotique à l'origine des dommages de l'ADN observés dans les spermatozoïdes humains, avec la mise en évidence d'autres stigmates apoptotiques, comme la chute du potentiel de membrane mitochondriale, l'externalisation des phosphatidylsérines, la présence de caspases activées ou encore l'expression du récepteur de mort Fas à la surface des spermatozoïdes (pour revue voir **article**

13 présenté en annexe). Au cours de ces dernières années, de nombreuses techniques ont été adaptées pour permettre d'évaluer la qualité de l'ADN spermatozoïdes. Les techniques les plus utilisées à l'heure actuelle sont la technique TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling), et le SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Le TUNEL et le SCSA ont la particularité de permettre une analyse par cytométrie de flux. Cela permet d'obtenir des résultats avec une grande reproductibilité, une bonne fiabilité, et peu de variations inter-essais (Evenson et al. 2002; pour revue voir Sergerie et al. 2005). D'autre part, en l'absence d'un cytomètre de flux, ces 2 techniques peuvent être évaluées également par microscopie à fluorescence in situ. Le SCSA mesure la stabilité de la chromatine des spermatozoïdes en milieu acide, en présence d'acridine orange. Celle-ci émet une fluorescence verte en cas de liaison avec de l'ADN intact double brin, orange en cas de liaison avec de l'ADN simple brin (Evenson et al. 2002). Les proportions d'ADN natif et dénaturé peuvent être mesurées par cytométrie de flux. On peut ainsi déterminer un index de fragmentation (DFI pour « DNA Fragmentation Index ») correspondant au rapport de fluorescence orange sur la fluorescence totale. La technique TUNEL, également très usitée, repose sur la fixation, aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN, de complexes biotine-désoxyuridine (dUTP) liés à un fluorochrome, grâce à une Terminal deoxynucleotidyl transférase. Le pourcentage de cellules ayant un ADN fragmenté peut alors être détecté soit par microscopie à fluorescence, ou par cytométrie de flux. Ainsi, de nombreuses études montrent que l'ADN des spermatozoïdes de patients oligospermiques est plus altéré que celui de patients infertiles normospermiques, mais également que dans cette population, on trouve une fragmentation ou un DFI plus important que chez les hommes fertiles (pour revue voir Sergerie et al. 2005). Pour la plupart des auteurs, il existerait en effet une corrélation entre l'augmentation du taux de fragmentation nucléaire et l'altération des paramètres spermatiques comme la numération, la mobilité la vitalité ou encore le pourcentage de formes typiques (pour revue voir **article 13**). Cependant un spermatozoïde mobile et de morphologie normale peut présenter un ADN fragmenté (Avendaño et al. 2009). En cas de fécondation d'un ovocyte avec un spermatozoïde ayant niveau élevé d'ADN fragmenté, et qui dépasserait les capacités de réparation ovocytaire, on a pu observer des altérations du développement embryonnaire avec un taux de blastocystes plus faible, un taux de grossesse diminué, et un taux de fausse couche augmenté (pour revue voir Zini et al. 2008). Tout le problème réside dorénavant dans la détermination de valeur seuil pour ces 2 techniques les plus couramment employées. Effectivement, en fonction des études et des populations étudiées, on observe un cut-off qui varie de 2,5% à 38,5 % pour le TUNEL, de 8,9% à 40% pour le SCSA (pour revue voir Sergerie et al. 2005).

c. L'étude du contenu chromosomique spermatique

Que le caryotype lymphocytaire du patient infertile soit normal ou pas, il est intéressant d'étudier le contenu chromosomique spermatique. En effet, chez les patients infertiles et notamment chez les patients présentant une oligospermie, les aneuploïdies spermatiques seraient plus fréquentes que dans la population générale (Retief et al. 1984 ; pour revue voir **article 13**).

Cette étude du contenu chromosomique spermatique est basée sur l'utilisation de la technique de FISH (fluorescence in situ hybridization) sur spermatozoïdes. Classiquement, 3 sondes sont utilisées : 2 pour les chromosomes sexuels et 1 pour les autosomes (X,Y et 18) (cf. le chapitre méthodes). Dans certaines situations que nous ne détaillerons pas, le caryotype lymphocytaire du patient met en évidence des anomalies de structure et/ou de nombre de chromosomes (translocations réciproques, Robertsoniennes, inversions péri ou paracentriques, réarrangements chromosomiques complexes...). Dans ces cas particuliers, d'autres sondes d'intérêt seront choisies en fonction des chromosomes impliqués dans le remaniement chromosomique et tout l'enjeu du conseil génétique résidera dans l'établissement du risque génétique gamétique et de l'impact éventuel du remaniement sur la grossesse et l'enfant à naître (risques de fausses couches, de viabilité avec malformations...).

Dans la population des patients infertiles à caryotype normal, population qui nous intéresse ici, le taux de spermatozoïdes dont le contenu chromosomique est anormal n'excède pas 2% quand 3 chromosomes sont analysés (Shi et Martin 2001 ; Tempest et Martin 2009). Ceci dit, il est parfois intéressant nous le verrons d'évaluer le risque génétique gamétique chez ces patients. Certaines anomalies morphologiques spermatiques sont en effet associées, nous le verrons à un risque d'aneuploïdie spermatique qui peut se révéler élevé. De plus il serait intéressant de pouvoir sélectionner un spermatozoïde dont le contenu chromosomique est normal, simplement en l'observant. Nous verrons que cette approche nécessiterait d'établir des liens forts entre la morphologie spermatique et le contenu chromosomique du spermatozoïde vivant.

4. Moyens d'étude de l'acrosome des spermatozoïdes fixés

Physiologiquement, la fixation à la zone pellucide induit la réaction acrosomique du spermatozoïde. La réaction acrosomique est la fusion des membranes plasmique et acrosomique externe du spermatozoïde conduisant à la formation de vésicules se dispersant

progressivement avec libération concomitante du contenu acrosomial. Cette réaction se caractérise par un influx d'ions calcium et un efflux de protons à travers la membrane plasmique périacrosomique. Dans les conditions physiologiques, seuls les spermatozoïdes capables peuvent faire leur réaction acrosomique. Une fois la réaction acrosomique achevée, le spermatozoïde n'est alors recouvert en avant que par la membrane acrosomique interne qui peut ainsi être exposée à l'ovocyte. La microscopie électronique est la seule méthode directe permettant de visualiser de manière certaine l'acrosome, mais n'est pas utilisable en routine. Plusieurs tests ont été développés utilisant des marqueurs fluorescents différents. Il est possible d'évaluer le statut acrosomique des spermatozoïdes en utilisant des lectines ou des anticorps conjugués à des fluorochromes. Plusieurs lectines de spécificité différente, existent. Ainsi, les lectines d'*Arachis hypogea* (peanut agglutinin ou PNA) conjuguées à la fluorescéine se lient à la membrane acrosomique externe et les lectines de *Pisum sativum* (Pisum sativum agglutinin ou PSA) mettent en évidence le contenu acrosomique (pour revue voir **article 13**). Les spermatozoïdes ayant réalisé leur réaction acrosomique perdent leur fluorescence. La membrane acrosomique interne peut être visualisée par l'utilisation de la concanavaline A ou par un anticorps monoclonal comme le CD46, marqués à la fluorescéine. La réaction acrosomique se traduit, ici, par l'acquisition d'une fluorescence et non par sa perte comme pour les techniques précédentes. En pratique, la réaction acrosomique spontanée et la réaction acrosomique induite sont mesurées. Il est important de noter qu'un marqueur de vitalité est indispensable quand on étudie la réaction acrosomique pour différencier la perte physiologique de l'acrosome qu'induit la réaction acrosomique de la perte de l'acrosome par mort du spermatozoïde (Aitken 2006 ; Aitken et Koppers 2011). Normalement le taux de réaction acrosomique spontanée au moment de l'éjaculation est faible (2-4%) (Aitken 2006 ; Aitken et Koppers 2011), en tous cas généralement inférieur à 10%. Des tests reposant sur la détection de la réaction acrosomique après induction ont été mis au point. Les inducteurs potentiels sont les ionophores calciques tels que l'ionomycine et A23587, la progestérone, la zone pellucide, le fluide folliculaire humain ou encore l'acide hyaluronique... L'induction par le calcium ionophore est la technique la plus employée (pour revue voir **article 13**). Un pourcentage de réaction acrosomique spontanée trop élevé et/ou un faible taux de réaction acrosomique inducible sont de mauvais pronostic pour l'activité fécondante du sperme. Deux types d'anomalies sont retrouvés chez le patient infertile. La réaction acrosomique prématurée est définie par la présence de plus de 20% de spermatozoïdes « acrosome réagis » dans l'éjaculat et la réaction acrosomique insuffisante par le fait que la réaction acrosomique est difficilement

inductible. La détermination du taux de réaction acrosomique spontanée et du taux de réaction acrosomique induite par le calcium ionophore A23587 permet de calculer un score, le score ARIC, pour Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge, qui est la différence des pourcentages de spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomique, avant et après induction. Les valeurs normales du score ARIC sont comprises entre 20 et 98%. Chez l'homme infertile, un score inférieur à 10 % traduit des capacités fécondantes diminuées du sperme et incite à privilégier l'ICSI (pour revue voir **article 13**).

III. Les moyens d'étude de la morphologie et des fonctions du spermatozoïde humain vivant

1. Moyens d'étude de la morphologie des spermatozoïdes vivants

a. Etude de la morphologie des spermatozoïdes vivants au grossissement de l'ICSI

En ICSI, le choix du spermatozoïde à injecter est réalisé au grossissement x200 ou x400 sur des spermatozoïdes vivants non colorés, non fixés en utilisant le contraste de Hoffman (Figure 17). Le choix repose sur une évaluation de la taille de la tête, de sa forme, de la présence ou non d'une angulation flagellaire ou d'un reste cytoplasmique, et sur une évaluation du mouvement des spermatozoïdes préalablement sélectionnés par une technique de gradient de densité et ralentis par un milieu type PVP (polyvinylpyrrolidone). Cette technique a un pouvoir de résolution bien plus faible que celui de la microscopie électronique par exemple mais elle présente l'avantage de ne nécessiter ni coloration, ni fixation des spermatozoïdes qui peuvent alors être observés puis sélectionnés et utilisés en AMP.

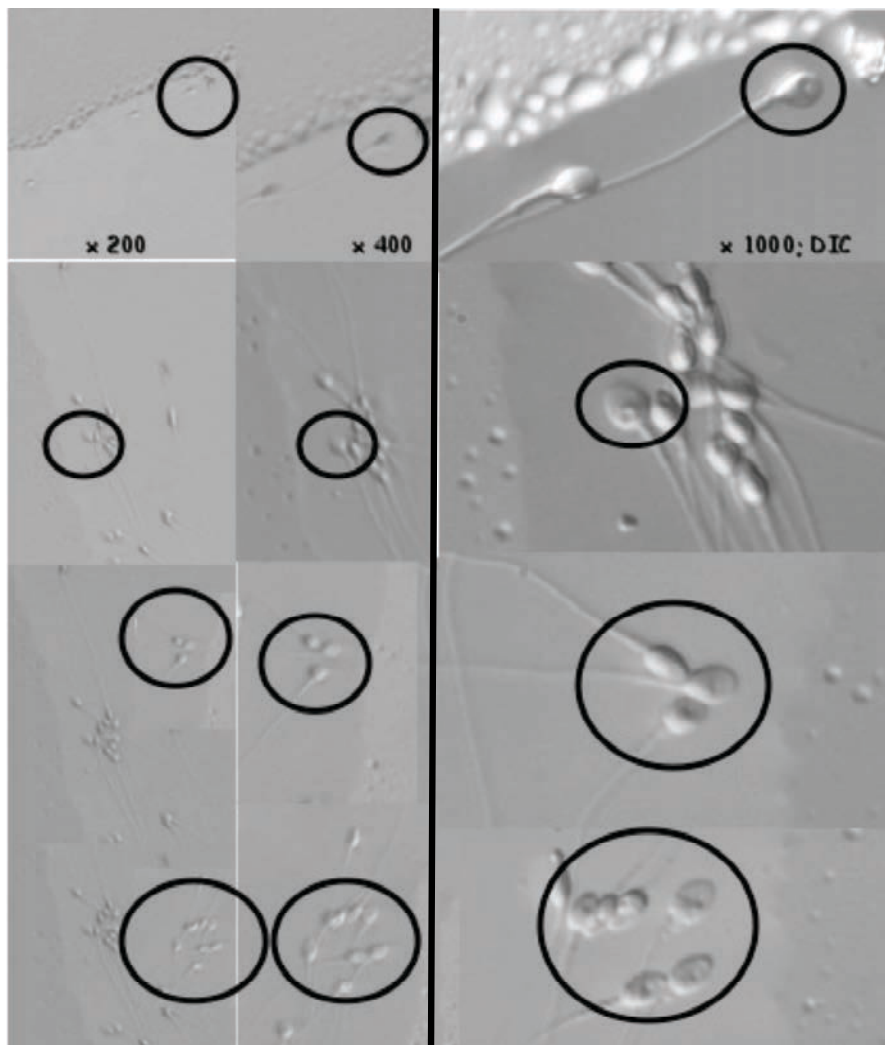


Figure 17 : Diverses morphologies spermatiques telles qu'elles peuvent être observées en ICSI (x200 et x400) et en MSOME (x1000 ; DIC). *Photos de F. Boitrelle.*

b. Le MSOME (Motile Sperm Organellar Morphology Examination)

A côté de cette observation conventionnelle en ICSI, le MSOME est une évaluation de la morphologie spermatique à fort grossissement à l'aide d'un microscope optique inversé équipé d'un objectif x100, de la méthodologie du contraste interférentiel de Nomarski et d'un grossissement obtenu par un système de caméra à zoom numérique, de telle façon à observer le spermatozoïde avec un grossissement total de plus de 10000 fois (x1000 dans les objectifs), sans coloration ni fixateur et en temps réel. A ce grossissement, le spermatozoïde est constitué d'une tête et d'un flagelle dont on peut clairement distinguer la pièce

intermédiaire. La forme de la tête et notamment la forme de la base de la tête sont visibles, beaucoup mieux qu'aux grossissements x200 ou x400 (figure 17). Au niveau de la tête de certains spermatozoïdes, le contraste interférentiel de Nomarski permet d'observer des « vacuoles ». Quand cette thèse a débuté, le support structural et la signification de ces vacuoles demeuraient inconnus. Avant même de connaître la nature des vacuoles observées, quelques auteurs ont défini le meilleur, le « top » spermatozoïde, c'est-à-dire celui qu'ils considèrent comme plus à même d'induire le développement d'un embryon viable capable de s'implanter. Il s'agissait du spermatozoïde de morphométrie normale non porteur de vacuole. Ces mêmes auteurs ont alors publié des classifications des spermatozoïdes observés en MSOME. Dans la figure ci-dessous (figure 18), nous présentons notre classification qui est adaptée de celle de Vanderzwalmen et al. (2008). Cette classification est la suivante :

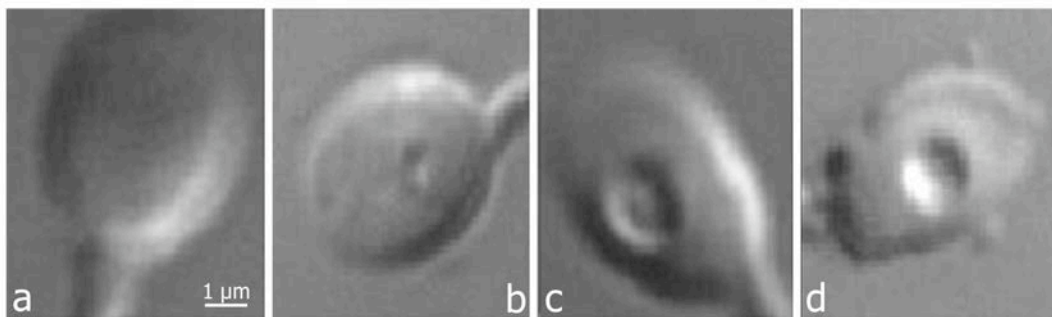


Figure 18 : Diverses morphologies spermatiques telles qu'elles peuvent être observées en MSOME. Photos de *F. Boitrelle*.

- Type I : spermatozoïde de morphométrie normale sans vacuole (a)
- Type II : spermatozoïde de morphométrie normale porteur de moins de 2 petites vacuoles occupant chacune moins de 4% de la surface de la tête (b)
- Type IIIa : spermatozoïde de morphométrie normale porteur de plus de 2 (> 2) petites vacuoles occupant chacune moins de 4% de la surface de la tête
- Type IIIb : spermatozoïde de morphométrie normale porteur d'une plus large vacuole (c)
- Type IV : spermatozoïde de morphologie anormale porteur ou non d'une vacuole (d)

Dans notre laboratoire, nous avons adopté la classification de Vanderzwalmen et al. (2008) pour sa simplicité de réalisation et parce qu'elle apparaît discriminante dans le choix du spermatozoïde. Nous observons aussi les spermatozoïdes au grossissement x400 en contraste de Hoffman (après les avoir observés en MSOME) pour voir si les anomalies observées en MSOME (anomalies de morphologie ou présence de vacuoles) auraient pu être visualisées au grossissement classique de l'ICSI. Ceci nous permettra de déterminer l'intérêt ou non de la technique d'IMSI lors des tentatives d'AMP ultérieures.

2. Moyens d'étude du noyau et de l'acrosome des spermatozoïdes vivants

C'est parce qu'il n'existe pas (encore) de moyen d'étudier les fonctions nucléaires et acrosomiques des spermatozoïdes vivants que cette thèse s'est attachée à établir des liens entre la morphologie, les marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le contenu chromosomique et les capacités fécondantes du spermatozoïde humain vivant.

Il apparaît très clairement que même si les spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques grossières peuvent être vus au grossissement de l'ICSI, l'ICSI ne permet pas de différencier un spermatozoïde dont la chromatine est bien condensée de celui dont la chromatine est mal condensée, un spermatozoïde à ADN fragmenté d'un spermatozoïde à ADN intact, un spermatozoïde euploïde, d'un spermatozoïde aneuploïde ni même un spermatozoïde qui a fait sa réaction acrosomique de celui qui ne l'a pas faite.

En ce qui concerne l'IMSI, l'équipe de Bartoov avait souligné l'importance de la morphologie spermatique dans le choix du spermatozoïde à injecter (Bartoov et al. 2002 ; Berkovitz et al. 2005). Le spermatozoïde dont la tête est de morphologie anormale (petite, grande, amincie, large ou encore porteuse d'une excroissance) est capable de féconder un ovocyte mais les taux de grossesse clinique chez les femmes dont les ovocytes ont été injectés avec ce type de spermatozoïdes sont quatre fois plus faibles et les taux de fausses couches spontanées six fois plus importants que chez des femmes dont les embryons proviennent de l'injection intra-ovocytaire d'un spermatozoïde de morphologie normale (Berkovitz et al. 2005). Ce n'est qu'en 2006, que ces mêmes auteurs précisent l'importance de l'évaluation des « vacuoles » observées au niveau des têtes spermatiques. Ils considèrent cette fois les « vacuoles » comme le principal critère prédictif du succès de l'IMSI (Berkovitz et al. 2006). Vanderzwalmen et al. (2008) considèrent, eux aussi, que la taille et le nombre de « vacuoles » spermatiques observées influencent les résultats de l'IMSI, avec

un taux maximal de blastocystes obtenus à J5, de grossesses évolutives et d'accouchements obtenus par l'injection intra-ovocytaire de spermatozoïdes non porteurs de « vacuoles » (type I) ou porteurs de moins de deux petites « vacuoles » occupant au total moins de 4% de la surface de la tête spermatique (type II). Ainsi le choix du « meilleur » spermatozoïde nécessiterait de prendre en compte le nombre et la taille des « vacuoles » observées pour améliorer les chances de développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste et augmenter les taux d'implantation embryonnaire. Plus récemment, pour Cassuto et al. (2009), le choix du « meilleur » spermatozoïde passe par l'établissement d'un score qui évalue la morphologie de la tête et notamment de la base de la tête spermatique, l'angulation ou non de la pièce intermédiaire, la présence ou non d'un reste cytoplasmique et la présence ou non de « vacuoles ». Mais si l'IMSI et la sélection d'un spermatozoïde de morphologie normale non porteur de vacuole semblait pouvoir donner de meilleurs résultats en terme de blastocystes, de grossesses et d'accouchements que l'ICSI, encore fallait-il comprendre pourquoi. Cette thèse s'est attachée à comprendre ce pourquoi.

Méthodes

Sont décrites ici les principales techniques utilisées dans la thèse, leur méthode de réalisation, leur mise au point éventuelle et leur norme.

I. Méthodes de sélection des spermatozoïdes

1. Préparation de la fraction migrée de spermatozoïdes

La préparation d'une fraction migrée de spermatozoïdes se fait, à l'image du test de migration survie (TMS). 1 ml de sperme sont déposés sur un gradient de deux couches de 1ml de PureSperm® (PureSperm 100, Nidacon) de densités différentes (90% et 45% par exemple). Une centrifugation (1500 tours/min) pendant 20 min est réalisée. Le surnageant est retiré et le culot est remis en suspension dans 2 ml d'IVF (Universal IVF Medium, Medicult) et centrifugé (1500 tours/min pendant 10 min). Finalement, après retrait du surnageant, le culot résultant est remis en suspension dans 0,5 ml d'IVF. Cette suspension correspond à la fraction migrée de spermatozoïdes.

2. Sélection des spermatozoïdes au grossissement de l'ICSI

Sous la hotte, une boîte est réalisée comme suit. Une microgoutte de 7 µl de spermslow® (Spermslow, Medicult) est déposée dans une boîte en plastique (Falcon 1006). A proximité, on dépose 2-3 µl de la fraction migrée de sperme. Sous la loupe, un pont est réalisé, à l'aiguille, entre la goutte de spermslow et la goutte de la fraction migrée. Le spermslow est un milieu ralentisseur contenant aussi de l'acide hyaluronique qui permettrait de sélectionner le spermatozoïde sur des critères de maturité de la tête spermatique. Afin d'éviter la dissémination, les gouttes sont recouvertes d'huile. Dans d'autres études présentées dans le chapitre résultat, un autre milieu est utilisé, il s'agit de la polyvinylindione (PVP) utilisée comme ralentisseur de spermatozoïdes. Une goutte de 5µl de PVP est étirée dans la boîte et une goutte de 0.8 à 2 µl est déposée à une de ces extrémités.

Dans tous les cas, la sélection des spermatozoïdes se fait par observation au grossissement x200 ou X400 sur des critères de mobilité et des critères de normalité morphologique. Avec le spermslow, le spermatozoïde dont le flagelle bouge, mais dont la tête est arrêtée est sélectionné ; avec la PVP, le spermatozoïde sorti de la PVP et mobile est sélectionné à l'aide d'un micromanipulateur. Les spermatozoïdes sélectionnés sont déposés sur des lames à

puits, dans une goutte de 0,5 µl d'eau stérile ou de milieu IVF (Universal IVF Medium, Medicult) selon les techniques utilisées ensuite.

3. Sélection des spermatozoïdes au grossissement de l'IMSI

En IMSI, les boîtes utilisées sont en verre pour ne pas être dépolarisantes. Ce sont des boîtes Willco (Willco, Willcowells, BV). La boîte est préparée de la même façon qu'en ICSI et observée à fort grossissement (x10000) à l'aide d'un objectif x100 à sec, à température ambiante. Une caméra avec zoom rattachée à un écran permet l'observation des spermatozoïdes. À l'aide d'un micromanipulateur Nikon (Nikon Eclipse 2000-U), équipé d'un microscope inversé et d'un système d'aspiration Narhishige permettant une aspiration des spermatozoïdes sélectionnés dans la micropipette.

Les spermatozoïdes sélectionnés sont déposés sur des lames à puits, dans une goutte de 0,5 µl d'eau stérile ou de milieu IVF (Universal IVF Medium, Medicult) selon les techniques utilisées ensuite. Des calques d'un spermatozoïde de morphologie normale et des transparents représentant diverses tailles de vacuoles sont utilisés lors de la sélection.

II. Étude des qualités nucléaires spermatiques

1. La coloration au bleu d'aniline acétié

Cette coloration met en évidence les histones riches en lysine. Les lames à analyser (fraction migrée ou spermatozoïdes pré-sélectionnés) sont fixées à l'éthanol 95% pendant 5 minutes puis immergées pendant 5 minutes dans une solution de bleu d'aniline acétié à 5%, préparée extemporanément (dissolution de 1 g de bleu d'aniline (@Blu anilina, Farmitalia carlo erba) dans 0,8 ml d'acide acétique, ajustement du volume avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 20 ml et filtration de la solution obtenue). Les lames sont rincées dans l'eau distillée (3x1minute) puis déshydratées par immersion successive dans une solution d'éthanol de densité croissante (éthanol à 95 % 3 minutes ; éthanol 100% 3 minutes) et séchées à l'air libre. Au microscope optique, au grossissement x1000, les noyaux spermatiques contenant beaucoup d'histones sont colorés en bleu foncé (figure 19). Quand toute la tête du spermatozoïde est bleu foncé, la chromatine est dite totalement mal condensée. Quand 20-50% de la tête est coloré en bleu foncé, la chromatine est dite

partiellement non condensée. Les noyaux spermatiques contenant moins de 15-20% d'histones sont non colorés et apparaissent bleu pâle (Figure 19).

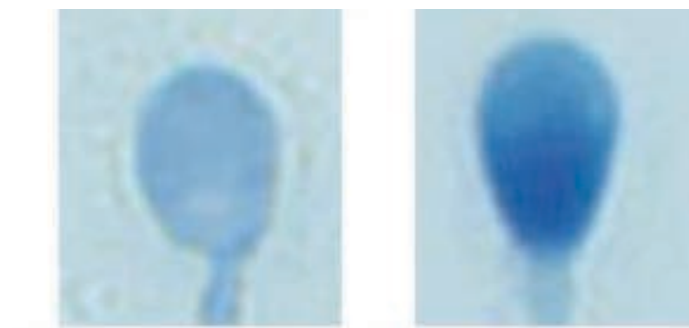


Figure 19 : Photos de spermatozoïdes colorés bleu d'aniline acétifié, a : spermatozoïde à chromatine normalement condensée, b : spermatozoïde à chromatine totalement non condensée. *D'après Boitrelle et al, 2011 (article 1).*

2. La technique TUNEL *in situ* sur spermatozoïdes

La technique TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated (TdT) dUTP Nick End Labelling) permet d'étudier la fragmentation de l'ADN spermatique. Les cassures simple et double brin de l'ADN seront visualisées par l'incorporation de nucléotides marqués à la FITC (fluorescéine isothiocyanate), au niveau des extrémités 3'OH de ces cassures par l'action d'une enzyme : la Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT. Les lames sont immergées pendant 14 minutes dans une solution de SDS Citrate 0,1% préparée extemporanément (1ml de Citrate de Sodium® 3,8% + 400µl de SDS® 10% + 38,6 ml de PBS). Les lames sont ensuite rincées dans du PBS (2x3 minutes) puis séchées. Dans chaque puits, on dépose 5 µl d'une solution de TdT- dUTP® (In Situ Cell Death Kit Detection, Roche, 1 volume de TdT pour 9 volumes de dUTP). Les lames sont recouvertes d'une lamelle scellée au Ruberciment® et incubées dans l'obscurité pendant 2 heures à 37°C en chambre humide. A l'issue de l'incubation, les lamelles sont retirées, les lames sont lavées au PBS (3 x 3 minutes) puis séchées et conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Une contre-coloration avec 3 µL de DAPI® (4',6-diamino-2-phenyl indole) est effectuée avant la lecture au microscope à épifluorescence. Les spermatozoïdes dont le noyau est

DAPI+/FITC+ (vert et bleu) ont un ADN fragmenté. Les spermatozoïdes dont le noyau n'est pas marqué à la FITC DAPI+/FITC- (bleu) ont un ADN non fragmenté (figure 20). Pour chaque série de lames, deux lames contrôle (contrôle négatif et positif) sont techniques selon la même procédure. Ces lames correspondent au sperme de patients pour lesquels une étude de la fragmentation de l'ADN spermatique avait été évaluée à 4 % et 20% respectivement. Dans notre laboratoire, la norme pour un sperme entier lavé non migré a été évaluée comme inférieure à 13% (Frainais et al. 2010) pour une lecture sur 500 spermatozoïdes.

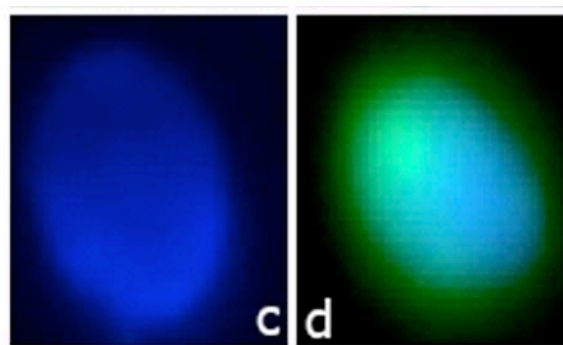


Figure 20 : Photos d'un spermatozoïde à ADN fragmenté après réalisation de la technique TUNEL, c : noyau spermatique DAPI+ d : le même noyau spermatique FITC+. *D'après Boitrelle et al, 2011.*

3. La technique de FISH sur spermatozoïdes

La technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est une technique de cytogénétique moléculaire qui met en évidence les aneuploïdies spermatiques pour les chromosomes étudiés. Nous ne détaillerons ici que la FISH X,Y,18. Elle repose sur l'hybridation spécifique d'une sonde à une séquence d'ADN. La sonde est une séquence d'oligonucléotides complémentaires de la séquence d'ADN à étudier. Dans cette étude, la technique utilise trois sondes centromériques, couplées à un fluorochrome différent, hybridées simultanément, de façon à obtenir un triple marquage pour chaque spermatozoïde. Le chromosome X est marqué en vert, le chromosome Y en rouge et le chromosome 18 en aqua (Aneuvysion -DNA Probe kit ; Abbott) (figure 21). Cette technique est réalisée en plusieurs étapes décrites ci-après:

- Pré-traitement des lames :

Il diffère en fonction des spermatozoïdes étudiés. Soit le sperme entier est étudié, soit la FISH est réalisée sur des spermatozoïdes sélectionnés. Pour le sperme entier, après liquéfaction, une centrifugation est réalisée (1500tr/min pendant 5 minutes). Après élimination du liquide séminal, le culot est lavé deux fois dans 1,5 ml d'eau stérile. Les spermatozoïdes sont alors re-suspendus dans une solution de Carnoy acétique (3 volumes de méthanol pour 1 volume d'acide acétique) et le prélèvement est conservé à -20°C en attente d'analyses ultérieures. Finalement, le jour de l'analyse, une goutte de cette suspension de spermatozoïdes est étalée sur une lame dégraissée. Pour les spermatozoïdes sélectionnés, ce pré-traitement n'est pas effectué et les spermatozoïdes sont directement fixés à l'aide de la solution de Carnoy acétique pendant 5 minutes.

- Perméabilisation, décondensation des noyaux spermatiques :

Les lames sont successivement immergées dans une solution de SSC (sodium, sulfate, citrate) qui sert de perméabilisant à 37°C pendant 30 minutes puis dans une solution de méthanol pendant 5 min. La décondensation de la chromatine des noyaux spermatiques est réalisée par immersion des lames dans une solution de soude (NaOH, 1 Molaire) pendant 1 minute et 20 secondes au maximum. Cette décondensation chromatiniennne est nécessaire pour permettre l'accessibilité des sondes à l'ADN. Les lames sont ensuite lavées dans le PBS (3x3 minutes) puis déshydratées dans des solutions d'éthanol de densité croissante (éthanol 70% 1 min 30 s, éthanol 85% 1 min 30 s et éthanol 100% pendant 1 min 30 s).

- Hybridation et lavages:

Les lames sont ensuite séchées et 3µl du mélange des 3 sondes sont déposés dans chaque puits. La lame est recouverte d'une lamelle scellée au Ruberciment®. Les lames sont déposées en chambre humide thermostatée programmable (Hybrite®) et incubées 4 min à 73°C puis à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, après avoir retiré les lamelles, les lames sont rincées dans une solution 1 (0,4% SSC et 0,3% NP40® Igepal, Sigma, Chemical Co) à 73°C dans un bain marie pendant 1min 45 s puis dans une solution 2 (2% SSC et 0,1% NP40® Igepal) à température ambiante 15 secondes. Ce lavage permet d'éliminer l'excédent de sondes non fixées.

- Lecture au microscope à épifluorescence :

Après séchage, la lecture des lames se fait grâce à une contre coloration au DAPI au

microscope à épifluorescence équipé d'une lampe à fluorescence et des filtres DAPI, FITC, Rhodamine et Aqua.

Pour chaque série de lames, une lame contrôle a été techniquée selon la même procédure.

Cette lame correspond au sperme d'un patient pour lequel une étude de FISH sur spermatozoïdes avait déjà été réalisée et pour lequel le taux d'aneuploïdies spermatiques avait été évalué à 1,9 %. Il s'agit du contrôle positif.

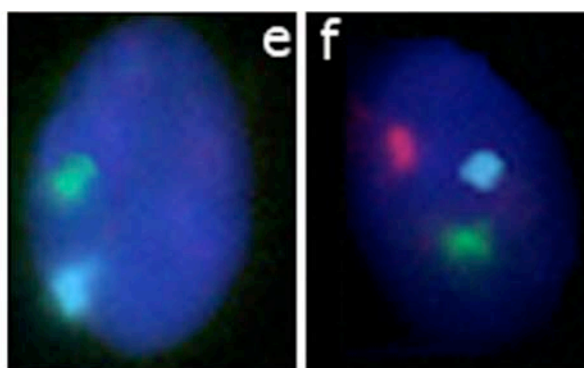


Figure 21: Photos d'un spermatozoïde euploïde (e) et d'un spermatozoïde aneuploïde (f). **D'après Boitrelle et al. 2011 (article 1).**

III. Etude de la réaction acrosomique

L'étude de la réaction acrosomique a été faite pour les spermatozoïdes sélectionnés. Les spermatozoïdes sont sélectionnés, aspirés et déposés sur des lames à puits. A l'issue de la sélection, les lames sont marquées à l'aide de deux marqueurs fluorescents. La membrane acrosomique externe est marquée à l'aide de la lectine PSA (lectine *Pisum sativum* agglutinin, Sigma). Pour cela, les lames sont immergées dans l'éthanol à 95%, à 4°C pendant 30 minutes pour perméabiliser la membrane spermatique. Puis 20 μL d'une solution de PSA diluée au 1/100^{ème} sont déposés dans chaque puits. Après incubation de 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité, les lames sont rincées dans le PBS (2x3 minutes) et séchées. Une contre coloration au DAPI, qui marque l'ADN, est effectuée (3 μl par puits) et les lames recouvertes de lamelles sont conservées à 4°C, à l'obscurité.

Dans les travaux présentés ici, la réaction acrosomique a été évaluée sur des spermatozoïdes sont observés en contraste interférentiel de Nomarski (DIC) puis en microscopie optique à fluorescence (figure 22).

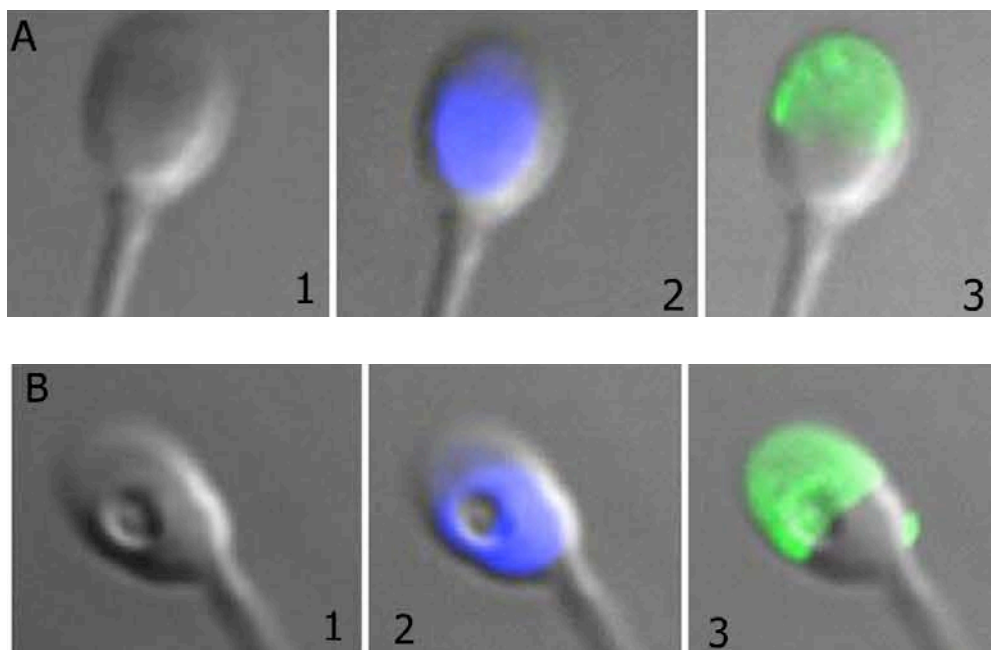


Figure 22 : Photos de spermatozoïdes avec une membrane acrosomique intacte (1 en DIC, 2 merge DIC/DAPI et 3 merge DIC/lectine PSA marquée à la FITC). *D'après Boitrelle et al. 2011 (article 1).*

IV. Mise au point de l'association de plusieurs microtechniques sur le même spermatozoïde

Nous avons mis au point plusieurs associations de microtechniques sur un seul et même spermatozoïde. Pour améliorer la qualité de nos recherches, nous souhaitons en effet pouvoir évaluer plusieurs caractéristiques fonctionnelles nucléaires et acrosomiques sur les mêmes spermatozoïdes. Ces associations ont parfois été compliquées à mettre au point mais elles nous permettaient d'étudier un même spermatozoïde de façon globale et de relier alors un aspect morphologique à un faisceau d'arguments fonctionnels. Par exemple, en ce qui concerne la première association, nous étions capables de connaître pour un seul et même spermatozoïde, son statut chromosomique, l'état de condensation de sa chromatine et la présence d'une éventuelle fragmentation de son ADN.

1. Etude de plusieurs caractéristiques nucléaires sur un même spermatozoïde: bleu d'aniline acétifié-TUNEL-FISH (X,Y,18)

Les premières caractéristiques que nous souhaitions étudier sur un seul et même spermatozoïde étaient trois caractéristiques nucléaires : la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et le contenu chromosomique. Une association « bleu d'aniline acétifié+FISH » avait été publiée avant que ce travail ne commence. Il nous fallait alors ajouter la technique TUNEL (soit entre les deux techniques soit en premier). La mise au point de cette triple procédure a nécessité quelques adaptations des techniques. Nos premiers essais ont montré que la technique TUNEL ne pouvait pas être effectuée en premier du fait de la décondensation qu'induisait cette technique.

Cette triple procédure a nécessité aussi la mise au point de la coloration au bleu d'aniline acétifié. Pour permettre la lecture de la coloration sur des spermatozoïdes isolés, il est décidé de sélectionner les spermatozoïdes et de les déposer dans une goutte d'eau distillée. Différents milieux ont été testés (IVF, PBS, spermslow) et seule l'eau distillée permet une lecture du bleu d'aniline interprétable, sans dépôts. Pour s'assurer que l'utilisation de l'eau distillée n'influait pas les résultats obtenus au bleu d'aniline, un contrôle a été effectué sur l'éjaculat de 20 patients ayant consulté pour un spermogramme en juin 2010. La coloration au bleu d'aniline acétifié a été réalisée, pour chaque patient, sur un frottis de sperme entier et sur un frottis de sperme entier dilué au demi dans de l'eau distillée. La lecture de 500 spermatozoïdes pour chaque frottis n'a révélé aucune différence, ni du pourcentage de têtes colorées en bleu, ni du pourcentage de têtes non colorées au bleu d'aniline acétifié.

Les protocoles des techniques TUNEL et FISH sont déjà utilisés individuellement dans notre laboratoire, dans le cadre du diagnostic. La succession de ces deux techniques sur les mêmes spermatozoïdes a nécessité une mise au point. La technique TUNEL doit précéder la technique de FISH. Un long rinçage dans du PBS à 37°C des lames permet d'éliminer la fluorescence résiduelle de la première technique TUNEL. Un contrôle a été effectué chez 20 patients dont les études de la fragmentation de l'ADN et de la FISH sur spermatozoïdes avaient été prescrites. Pour ces 3 patients, il n'existait aucune différence du taux d'aneuploïdies (lecture de 500 spermatozoïdes) que la technique de FISH soit précédée ou non de la technique TUNEL.

L'ordre de réalisation des trois techniques a du être mis au point et validé. La lecture des frottis de sperme de 2 patients a conclu que l'étude la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL devait être réalisée après la coloration par le bleu d'aniline. La lecture de 500 spermatozoïdes pour chaque frottis permet de conclure que la technique TUNEL augmente le pourcentage d'anomalies de condensation de la chromatine (bleu d'aniline) d'au moins 100%. La coloration au bleu d'aniline doit donc précéder la technique TUNEL. Comme la technique de FISH induit une décondensation chromatinienne, elle doit être réalisée en dernier.

La validation de cet ordre a été réalisée chez 10 patients pour lesquels une étude de la fragmentation de l'ADN et une étude de FISH sur spermatozoïdes avaient été prescrites et réalisées individuellement. Pour ces 10 patients, un frottis de sperme dilué au demi dans l'eau isotonique est coloré au bleu d'aniline puis techniqué selon la méthode TUNEL puis techniqué pour la FISH. Pour ces 10 patients, les résultats obtenus pour chacune des techniques sont comparés aux résultats obtenus sur les trois frottis de sperme entier techniqués individuellement. A la lecture de 500 spermatozoïdes par patient, il n'existe aucune différence significative des résultats obtenus pour ces trois techniques que celles-ci soient réalisées selon le protocole d'étude ou individuellement.

Nous avons donc adapté le protocole avec cet ordre : 1) bleu d'aniline acétifié 2) TUNEL 3) FISH. Suite à la coloration au bleu d'aniline acétifié les lames sont immergées dans une solution d'Acide Acétique-Méthanol (1 volume d'acide acétique pour 3 volumes de méthanol) pendant 10 minutes pour éliminer le colorant bleu puisque nous avons montré que l'acide acétique méthanol permettait d'éliminer la coloration au bleu. Après la technique TUNEL, les lames sont rincées pendant 20 minutes dans une solution de PBS à 37°C pour éliminer le marquage fluorescent (FITC) qui pourrait gêner la lecture de la FISH. Une fois cette association validée, il fallait utiliser une méthode fiable de relocalisation. Nous avons utilisé la plateforme METAFER®. Cette plateforme, permet une lecture classique en lumière blanche ou en épifluorescence et enregistre les coordonnées X et Y de chaque spermatozoïde pour permettre leur relocalisation après la réalisation de chacune des techniques.

2. Etude d'une caractéristique nucléaire et d'une caractéristique acrosomique d'un même spermatozoïde: bleu d'aniline acétifié- lectine PSA

La deuxième association que nous souhaitons réaliser était l'étude d'une caractéristique acrosomique et d'une caractéristique nucléaire dans les mêmes spermatozoïdes. Cette association a été validée chez 20 patients et ne nécessite aucune adaptation des techniques.

3. Etude d'une caractéristique nucléaire et de la morphologie précise d'un même spermatozoïde : bleu d'aniline acétifié-coloration de Papanicolaou

La troisième et dernière association que nous avons effectuée est l'étude sur les mêmes spermatozoïdes d'une caractéristique nucléaire, la condensation de la chromatine et l'étude de la morphologie spermatique grâce à la coloration de Papanicolaou. Cette association a été validée chez 20 patients et ne nécessite aucune adaptation des techniques.

V. Approches microscopiques utilisant des technologies innovantes

1. AFM : Microscopie à force atomique

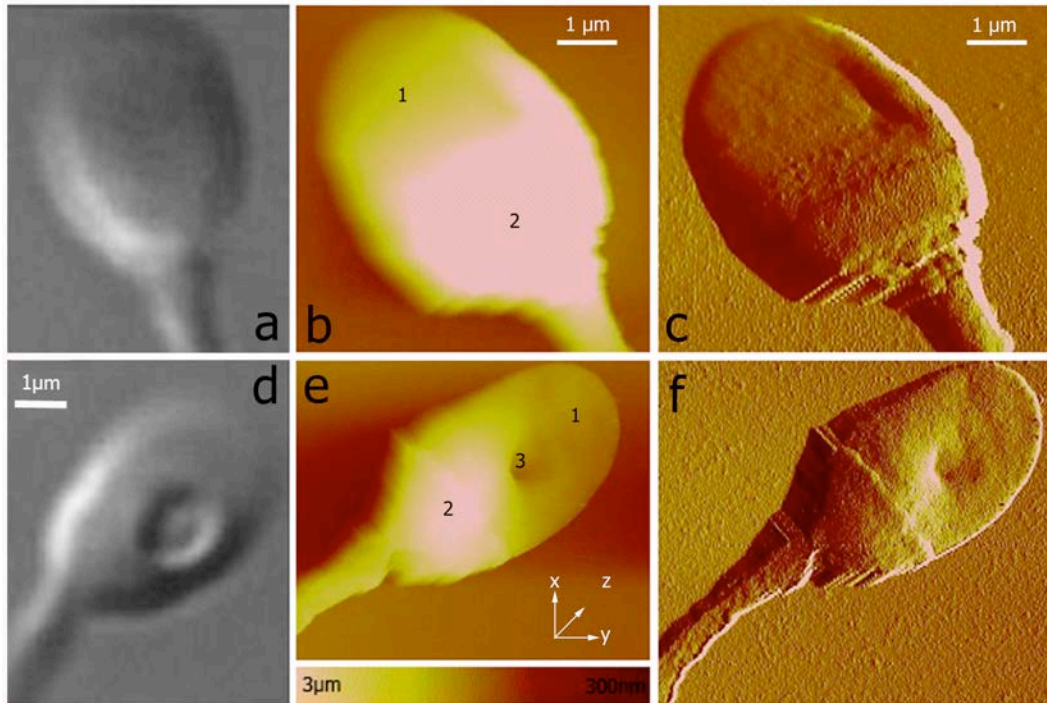


Figure 23 : Photos de spermatozoïdes en DIC (a,d) et en AFM (b,c,e,f). D'après *Boitrelle et al. 2011 (article 1)*.

Le microscope à force atomique est un instrument permettant d'analyser la topographie de la surface d'une cellule à l'échelle atomique. Doté d'une pointe métallique de 10 nanomètres de rayon montée sur un levier flexible, l'appareil enregistre les interactions entre les atomes de la pointe sondeuse et ceux de la surface à analyser. Les atomes ont tendance à s'attirer. Dans la plupart des cas, cette attraction est très faible et n'est perceptible qu'à très faible distance (forces de Van der Waals). À l'inverse, lorsqu'ils sont très proches, les atomes se repoussent du fait de la soumission des électrons du cortège électronique à la répulsion électrostatique. Ces forces d'interaction entre la surface sondée et la pointe provoquent des déplacements de la pointe, entraînant des déviations du levier qui sont enregistrées et traitées par ordinateur pour reconstituer le relief, c'est-à-dire une image très précise de la surface du spermatozoïde (à titre d'exemple d'image obtenue en AFM, cf. figure 23 détaillée dans le chapitre résultats).

C'est la première fois que des spermatozoïdes sont observés en AFM. Ceci a été possible grâce à une collaboration avec la plateforme d'Imagerie des Saints Pères et notamment grâce à Messieurs Christophe TOURAIN (ingénieur responsable de l'AFM) et Dominique SEGRETAÏN. Cette technique chronophage a été réalisée pour quelques spermatozoïdes de deux patients. Les spermatozoïdes sont sélectionnés, aspirés et déposés sur une lame dans une goutte de 0,5 µl d'IVF® (milieu n'altérant pas la surface du spermatozoïde) et immergés dans ce même milieu jusqu'à observation en AFM.

2. Microscopie à sectionnement optique et déconvolution

Grâce à la collaboration de Mr Jean Maurice PETIT, directeur de la plateforme de microscopie des Saint-Pères (Université Paris V) l'utilisation de la microscopie à sectionnement optique et déconvolution a été possible. La microscopie à sectionnement optique et déconvolution permet une analyse des spermatozoïdes en contraste interférentiel de Nomarski couplée à une analyse des mêmes spermatozoïdes en fluorescence. Le principe de la déconvolution est de permettre une reconstruction d'images post-acquisition. Contrairement à la microscopie confocale qui permet de focaliser le faisceau laser sur un plan focal pour améliorer la netteté de l'image, la microscopie à sectionnement optique et déconvolution nécessite un traitement des images (principe de déconvolution) pour en améliorer la netteté. Mais alors qu'en microscopie confocale, il existe une photodégradation du marqueur fluorescent exposé à un faisceau laser focalisé, en microscopie à fluorescence en sectionnement optique et déconvolution, ce problème de photoblanchiment n'existe pas. La qualité des images est donc améliorée.

Les spermatozoïdes sont observés en contraste interférentiel de Nomarski puis en microscopie optique à fluorescence. 27 à 35 coupes sont réalisés en z de façon à observer le spermatozoïde tous les 100-150 nanomètres et ce sur toute son épaisseur. Les images obtenues en contraste interférentiel de Nomarski sont alors comparées aux images obtenues en fluorescence. Les logiciels Image J et volume J (à titre d'exemple d'image obtenue en microscopie à déconvolution, cf. figure 24 détaillée dans le chapitre résultats) et Imaris (à titre d'exemple d'image obtenue en microscopie à déconvolution, cf. figure 25 détaillée dans le chapitre résultats) permettent une reconstruction des images et une modélisation du spermatozoïde en trois dimensions.

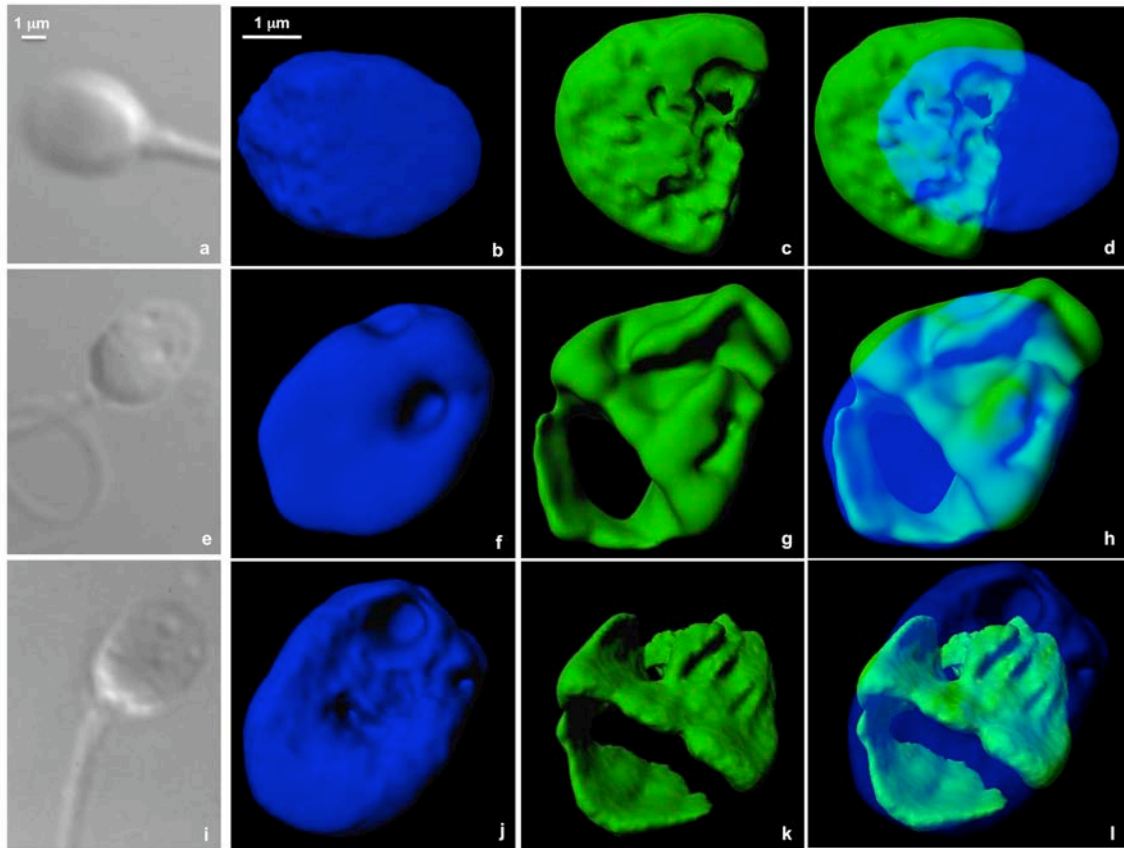


Figure 24 : Photos de spermatozoïdes en DIC (a,e,i) et en microscopie 3D après reconstruction des images. Le noyau est en bleu (DAPI), les membranes acrosomique en vert (lectine PSA FITC). D'après *Boitrelle et al. 2013(article 2)*.

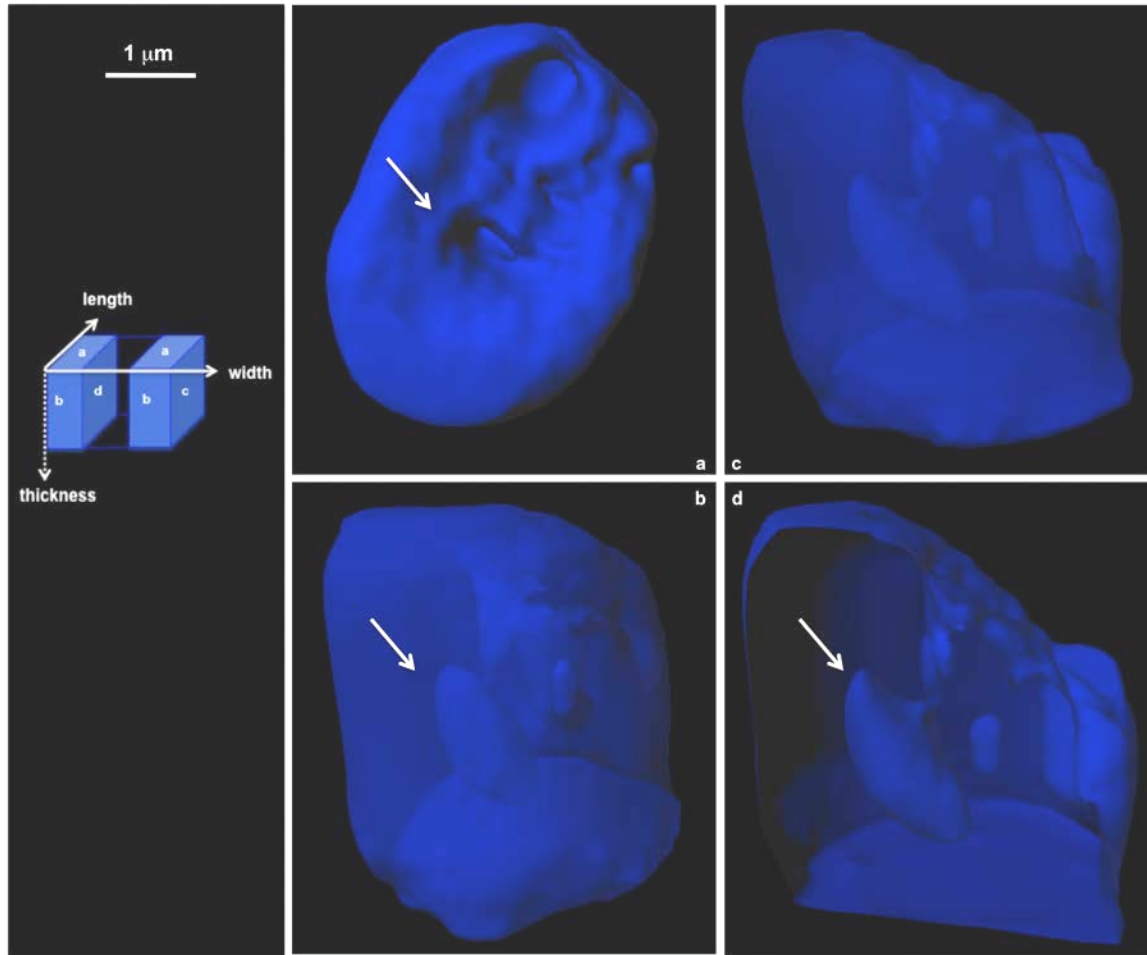


Figure 25 : Photos d'un noyau de spermatozoïde en microscopie 3D après reconstruction des images avec la surface en a, une vue de derrière par transparence (b), une vue de profil par transparence (c) et la même vue de profil après coupe artificielle (d) permettant de visualiser finement les structures impliquées dans les vacuoles. D'après *Boitrelle et al. 2013 (article 2)*.

Résultats

Liste des publications

Les articles 1 à 8 seront présentés et discutés dans ce chapitre résultats. Les articles 9 à 14 sont des articles de revue ou des chapitres de mise au point publiés dans des ouvrages en Français ou en Anglais. Ils ont été utilisés dans les rappels bibliographiques ou permettront d'étayer la discussion de nos résultats. Ils sont présentés en annexe.

Publications dans des revues en Anglais avec comité de lecture

1. **Boitrelle F**, Ferfour F, Petit J, Tourain C, Bailly M, Bergère M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm-head vacuoles observed in motile spermatozoa under high-magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Human Reprod* 2011; 26: 1650-1658.
2. **Boitrelle F**, Albert M, Petit J, Ferfour F, Wainer R, Bailly M, Vialard F, Selva J. Small human sperm vacuoles observed under high magnification are pocket-like nuclear concavities linked to chromatin condensation failure. *Reprod biomed online*, 2013; 27: 201-211.
3. **Boitrelle F**, Pagnier M, Athiel Y, Swierkowski-Blanchard N, Alter L, Muratorio C, Torre A, Vialard F, Albert M, Selva J. Is a spermatozoon's morphology related to its chromatin status? *Asian Journal Andrology*, article en révision.
4. **Boitrelle F***, Hammoud I*, Ferfour F, Vialard F, Bergère M, Wainer M, Bailly M, Albert M, Selva J. Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia* 2013; 45: 163-170.
5. Chelli H, Ferfour F, **Boitrelle F**, Albert M, Molina Gomes D, Selva J, Vialard F. High-magnification sperm selection does not decrease the aneuploidy rate in patients who are heterozygous for reciprocal translocations. *JARG* 2013; 30 :525-530.
6. Guthauser B, **Boitrelle F**, Albert M, Ketata F, Meynant C, Selva J, Vialard F. Contraindication of ART following a sperm FISH analysis, even though only 12% of the

spermatozoa had enlarged heads: a case report. *Syst Biol Reprod Med* 2013; 59: 214-217.

7. **Boitrelle F**, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergère M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa alters motile sperm organelle morphology, decreases the number of top spermatozoa and induces nuclear vacuolisation and chromatin decondensation. *J Androl* 2012; 33: 1371-1378.
8. **Boitrelle F**, Guthauser B, Alter L, Bailly M, Bergère M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J. High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: confirmed and potential indications. A literature review. *Reprod biomed online* 2014; 28: 6-13.
9. **Boitrelle F**, Guthauser B, Alter L, Bailly M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J. The nature of human sperm head vacuoles: a systematic literature review. *Basic and Clinical Andrology* 2013; 23:3-12.
10. **Boitrelle F**, Albert M. MSOME and sperm chromatin status
Non-invasive sperm selection for in-vitro Fertilization, Borges Jr and Agarwal A eds, Springer 2014. Chapitre de livre en Anglais sur invitation, envoyé à l'éditeur en octobre 2013.

Publications dans des revues en Français

- 11. Boitrelle F**, Vialard F, Bergère M, Atam-K S, Ferfour F, Bailly M, Selva J, Albert M. Le spermogramme en 2010. *Gynécologie obstétrique pratique* 2010; 228: 7-10.
- 12. Albert M, Boitrelle F**. Comment interpréter un spermogramme ? *Réalités en Gynécologie Obstétrique* 2011; 153: 1-5.
- 13. Boitrelle F**, Marchetti P, Mitchell V, Leroy-Martin B, Marchetti C. Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP. *Physiologie, Pathologie et Thérapie de la Reproduction chez l'Humain, Editeur Springer, 2011, chapitre 30*.
- 14. Boitrelle F**, Ferfour F, Salama S, Vialard F, Bergère M, Bailly M, Wainer R, Selva J, Albert M. De la nature des vacuoles spermatiques aux résultats et indications de l'IMSI. *Andrologie* 2011; 4: 234-239.

PARTIE 1

**Liens entre la morphologie, les marques
épigénétiques, le contenu chromosomique
et les capacités fécondantes du
spermatozoïde humain**

I. Morphologie spermatique et condensation de la chromatine (articles 1,2,3)

Quand cette thèse a débuté en 2010, plusieurs publications démontraient que l'IMSI et la sélection de spermatozoïdes de morphologie normale non porteurs de « vacuoles », ou porteurs de moins de deux petites « vacuoles » permettait d'améliorer les taux de blastulation des embryons, les taux de grossesses cliniques évolutives et de diminuer les taux de fausses couches spontanées précoces. Nous nous sommes alors efforcés de comprendre pourquoi. En associant plusieurs microtechniques sur les mêmes spermatozoïdes et en utilisant des méthodes d'imagerie novatrices et très résolutes nous avons d'abord tenté d'établir des liens forts entre des aspects morphologiques particuliers du spermatozoïde vivant à fort grossissement (porteur d'une large « vacuole » ou non) d'une part et une marque épigénétique (état de condensation de la chromatine), la qualité de l'ADN, un contenu chromosomique ou encore un statut acrosomique particulier d'autre part (**article 1**). Puis nous nous sommes intéressés à l'état de condensation de la chromatine et au statut acrosomique des spermatozoïdes porteurs de plus de deux petites « vacuoles » (**article 2**). Finalement, les résultats obtenus dans ces deux premiers articles nous ont amenés à nous intéresser à la condensation de la chromatine de « tous » les spermatozoïdes. Nous avons alors évalué cette marque épigénétique en fonction des différents aspects morphologiques que le spermatozoïde pouvait prendre au spermocytogramme (**article 3**).

1. Etablir des liens entre la morphologie du spermatozoïde vivant en IMSI (x10.000) et la condensation de sa chromatine

La technique d'IMSI permet d'observer les spermatozoïdes à plus fort grossissement. Certaines anomalies comme les « vacuoles » deviennent visibles au grossissement de l'IMSI alors qu'elles demeuraient invisibles au grossissement de l'ICSI. C'est le cas des petites vacuoles essentiellement, même si nous avons montré à Poissy que certaines larges vacuoles pouvaient aussi demeurer invisibles au grossissement de l'ICSI (cf. figure 17 ; données non publiées). Plusieurs études se sont alors intéressées à ces vacuoles et notamment aux plus larges. Quand cette thèse a commencé, rien de très précis n'était publié sur le sujet et tout le monde se posait la question de la nature acrosomique, nucléaire, membranaire ou multiple de ces « vacuoles ». Dans un premier temps, nous

avons tenté de déterminer si les larges « vacuoles » étaient de nature nucléaire et nous avons comparé la condensation de la chromatine des spermatozoïdes morphométriquement normaux porteurs de larges « vacuoles » à celle des spermatozoïdes morphométriquement normaux non porteurs de « vacuoles » (**article 1**).

a. La nature des larges vacuoles

Nous avons étudié ici les larges « vacuoles », occupant plus de 25% de la surface de la tête spermatique.

Article 1

Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation

Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J

Hum Reprod 2011; 26: 1650-1658

Chez **15 patients** présentant des caractéristiques spermatiques variées (spermes normaux, asthéo-tératozoospermiques ou tératospermiques), un total de **450 spermatozoïdes normaux et 450 spermatozoïdes morphométriquement normaux mais porteurs d'une large « vacuole » ont été sélectionnés, un à un**, à fort grossissement (x10000 et DIC). Sur chacun de ces spermatozoïdes, **trois microtechniques ont été réalisées successivement** : la coloration au bleu d'aniline acétifié pour l'étude de la condensation de la chromatine, la technique TUNEL pour celle de la fragmentation de l'ADN et la FISH avec les sondes X,Y,18 pour celle des aneuploïdies spermatiques. De plus, la **microscopie à force atomique** a été utilisée pour cartographier avec précision la surface spermatique et tenter de mettre en évidence d'éventuelles altérations de la membrane plasmique spermatique chez les spermatozoïdes vacuolés par rapport aux spermatozoïdes normaux. Finalement, la **microscopie à sectionnement optique et déconvolution** nous a permis de reconstruire de très belles images en 3 dimensions des spermatozoïdes. Ainsi

les rapports entre le noyau (marqué au DAPI) et l'acrosome (marqué à la lectine PSA) ainsi que le statut acrosomique, réagi ou non, ont pu être analysés dans 200 spermatozoïdes normaux ou vacuolés.

De cette étude il ressort, pour ce qui nous intéresse ici, que **la chromatine des spermatozoïdes est plus fréquemment non condensée et immature si le spermatozoïde est porteur d'une large « vacuole » que s'il n'en porte pas ($36,2\% \pm 1,9$ versus $7,6\% \pm 1,3$ respectivement ; $P < 0.0001$).** Par contre, il n'existe pas de différence significative du taux de fragmentation de l'ADN ($1,3\% \pm 0,4$ versus $0,7\% \pm 0,4$) ni du taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes ($2,2\% \pm 0,7$ versus $1,1\% \pm 0,5$) que ceux-ci soient porteurs ou non d'une large « vacuole ».

De plus, c'était la première fois que les spermatozoïdes étaient observés en microscopie à force atomique (AFM). La large « vacuole » n'est pas le reflet d'une altération (déchirure ou protrusion) de la membrane plasmique spermatique et n'est donc pas de nature membranaire. Elle correspond à un aplatissement localisé du noyau spermatique et à une dépression de la membrane plasmique en regard de la « vacuole ». En microscopie en 3 dimensions, et d'après les photographies et vidéographies obtenues, la large « vacuole » correspond bien à un aplatissement localisé du noyau spermatique qui devient anormalement concave comme une empreinte. La large vacuole peut alors être décrite comme une concavité nucléaire. A noter qu'aucun des 200 spermatozoïdes observés (porteur ou non d'une large « vacuole ») n'avait réalisé sa réaction acrosomique. **Nous avons donc conclu à la nature nucléaire exclusive de la large « vacuole » spermatique. C'est un aplatissement localisé, une concavité du noyau spermatique en lien avec une moindre condensation de la chromatine.** L'origine de cet aplatissement nucléaire pourrait être nucléaire (noyau à chromatine décondensée trop « mou » se laissant déprimer par la membrane) ou acrosomique (empreinte nucléaire laissée par les vésicules golgiennes au cours de la mise en place de l'acrosome).

Peu de temps avant ou après que cet article ne paraisse, deux autres études ont abouti à des résultats concordants en établissant des liens entre les larges « vacuoles » et la non condensation de la chromatine (Perdrix et al. 2011 ; Franco et al. 2012). Pour Perdrix et al. les spermatozoïdes porteurs de larges « vacuoles » ($>13\%$ de la surface de la tête) seraient plus fréquemment mal condensés (évaluation au bleu d'aniline) que les spermatozoïdes « tout venant » du sperme entier. Pour l'équipe de Franco, les spermatozoïdes porteurs d'une large « vacuole » (occupant $> 50\%$ de la surface de la tête)

présenteraient plus fréquemment une chromatine dénaturée (évaluation par l'utilisation de chromomycine A3) que les spermatozoïdes non vacuolés. Notons toutefois que dans ces deux études, la morphométrie des spermatozoïdes porteurs de large « vacuoles » n'était pas détaillée. Nous verrons dans l'article 3, que ce détail est important.

b. La nature des petites vacuoles

Alors que la nature nucléaire des larges « vacuoles » semblait établie, d'autres auteurs penchaient plutôt pour une nature acrosomique des « vacuoles » (Kacem et al. 2010 ; Montjean et al. 2012). Dans ces études, il n'a pas été fait de distinction entre les larges et les petites « vacuoles ». Nous nous sommes alors demandé si les petites « vacuoles » pouvaient avoir une nature différente de celle des larges. De plus, il est vrai que (contrairement aux petites « vacuoles ») de nombreuses larges « vacuoles » sont visibles au grossissement classique de l'ICSI (pour revue cf. **article 9 et 14** présentés en annexe). Alors, en s'intéressant à la nature des plus petites « vacuoles », nous pensions établir des liens entre cette nature et les résultats de l'IMSI et comprendre notamment pourquoi Vanderzwalmen et al. (2008) retrouvaient de meilleurs taux de grossesse à l'injection intra-ovocytaire de spermatozoïdes normaux en comparaison aux taux obtenus en injectant des spermatozoïdes porteurs de plus de 2 petites « vacuoles » (occupant moins de 4% de la surface de la tête chacune).

L'étude qui suit (**article 2**) s'est donc intéressée aux petites « vacuoles » multiples de la tête spermatique.

Article 2

Small human sperm vacuoles observed under high magnification (10000x) are nuclear concavities associated with chromatin condensation failure

Boitrelle F, Albert M, Petit JM, Ferfour F, Wainer R, Bergère M, Bailly M, Vialard F, Selva J

Reprod biomed online 2013; 27: 201-211

Nous avons utilisé la même approche que dans l'article précédent. Chez **15 patients** aux caractéristiques spermatiques variées, nous avons sélectionné à fort grossissement **450 spermatozoïdes morphométriquement normaux non porteurs de « vacuole »** et **450 spermatozoïdes de morphométrie normale mais portant plus de deux petites « vacuoles »** (occupant chacune moins de 4% de la surface totale de la tête spermatique). Dans cette étude, **deux microtechniques ont été effectuées successivement sur les mêmes spermatozoïdes** : le marquage à la lectine PSA (marqueur de la réaction

acrosomique) associé à un marquage du noyau au DAPI et la coloration au bleu d'aniline acétiifié (marqueur de l'état de condensation chromatinienne). Dans un premier temps, l'observation des 900 spermatozoïdes sélectionnés a été réalisée en **microscopie à 3 dimensions**, ce qui a permis d'établir le statut acrosomique (réagi ou non) de ces 900 spermatozoïdes ainsi que les contours et les rapports de leur acrosome et de leur noyau. Ensuite la coloration au bleu d'aniline permettait d'établir leur degré de condensation chromatinienne.

La chromatine des spermatozoïdes porteurs de petites « vacuoles » est plus fréquemment non condensée que celle des spermatozoïdes normaux ($39,8 \pm 2,4\%$ versus $9,3 \pm 1,3\%$, $p < 0.0001$). Par contre en ce qui concerne le pourcentage de spermatozoïdes acrosome-réagi, aucune différence n'est retrouvée entre les spermatozoïdes vacuolés ou non. Les petites « vacuoles » apparaissent en microscopie 3D comme de petites concavités nucléaires, parfois très profondes. Ces concavités sont semblables à des puits reliés à la surface du spermatozoïde par un pont parfois très étroit (cf. images de reconstruction en 3 dimensions présentées dans l'article).

D'après nos résultats, les petites « vacuoles » ont donc la même nature nucléaire que les larges. Elles sont elles aussi en lien avec une non condensation de la chromatine spermatique mais, ne sont pas en lien avec le statut « réagi » ou « non réagi » de l'acrosome.

2. Etablir des liens entre la morphologie du spermatozoïde fixé (x1000) et la condensation de sa chromatine

En analysant nos premiers résultats (**article 1 et 2**), nous avons parcouru la littérature et nous nous sommes rendus compte que la définition d'un spermatozoïde porteur de « vacuoles » était différente d'un article à l'autre. La majorité des études a en effet analysé les spermatozoïdes porteurs de vacuoles mais aussi potentiellement porteurs d'autres anomalies morphologiques. Dans nos travaux, contrairement à d'autres études (Perdrix et al. 2011 ; Franco et al. 2012) nous avons insisté sur le fait de sélectionner des spermatozoïdes morphométriquement normaux porteurs ou non de vacuoles. Nous voulions en fait éviter les éventuels biais que pouvait représenter la morphométrie du spermatozoïde (taille de la tête, forme de la tête et de la base par exemple) sur les résultats obtenus en terme de non-condensation. Pour mémoire, nous avons montré que 36,2% et que 39,8% des spermatozoïdes de morphométrie normale mais porteurs de larges ou de petites « vacuoles » (respectivement) présentaient une non-condensation de la chromatine. Pour Perdrix et al. (2011) 50,4% des spermatozoïdes porteurs de larges « vacuole »s (et potentiellement porteurs d'autres anomalies) présentaient une non-condensation de la chromatine au bleu d'aniline. Pour l'équipe de Franco (Franco et al. 2012), c'était 53,2% des spermatozoïdes porteurs de larges « vacuoles » (et potentiellement porteurs d'autres anomalies) qui présentaient une non-condensation de la chromatine au test à la chromomycine A3.

Etant donné que nous avons retrouvé des taux de non-condensation chromatinienne plus bas dans « nos » spermatozoïdes vacuolés morphométriquement normaux par ailleurs (comparativement aux deux études précédemment citées) nous avons alors voulu savoir si la morphométrie du spermatozoïde pouvait être en lien avec un statut chromatinien particulier. Dans l'article qui suit (**article 3**), l'existence de liens entre des aspects morphologiques spermatiques et une marque épigénétique (condensation de la chromatine) a alors été évaluée.

Article 3

Is a spermatozoon's morphology related to its chromatin status?

Boitrelle F, Pagnier M, Athiel Y, Swierkowski-Blanchard N, Torre A, Alter L, Muratorio C, Vialard F, Albert M, Selva J.

Asian journal Andrology, article en révision

Chez **20 patients présentant des taux élevés de non-condensation de la chromatine spermatique** mais aux caractéristiques spermatiques normales selon le dernier manuel de l'OMS, nous avons pu établir un « risque » de non-condensation de la chromatine en fonction de la morphologie spermatique. Pour un total de 3749 spermatozoïdes (1013 de morphologie normale et 2736 de morphologie anormale), il s'avère que les spermatozoïdes de morphologie normale présentent plus souvent une condensation de la chromatine adéquate (absence de marquage du spermatozoïde par la coloration au bleu d'aniline) que les spermatozoïdes de morphologie anormale ($p < 0,0001$). En moyenne, 94,4% des spermatozoïdes à têtes multiples, 85,0% des spermatozoïdes macrocéphales, 80,9% des microcéphales, 41,8% des spermatozoïdes avec une base anormale, 46,1% de spermatozoïdes avec un acrosome malformé ou absent, 50,2% des spermatozoïdes porteurs d'une large « vacuole » ou de plus de deux petites « vacuoles », 50,0% des spermatozoïdes avec des anomalies multiples, 56,3% des spermatozoïdes à tête allongée et 64,3% des spermatozoïdes à tête amincie présentent une chromatine non condensée. C'est néanmoins le cas pour 23,3% des spermatozoïdes de morphologie normale. A notre connaissance, **c'est la première fois que des liens sont établis entre divers aspects morphologiques spermatiques et une marque épigénétique** (qualité de la condensation chromatinienne). **Nous confirmons ici, l'intérêt que nous avons à étudier le statut chromatinien des spermatozoïdes vacuolés par ailleurs morphométriquement normaux pour évaluer rigoureusement la nature des « vacuoles » et leur lien avec la non-condensation chromatinienne.** De plus, nous montrons que l'étude de la morphologie spermatique, et l'éviction de certaines anomalies spermatiques repérables au cours de l'ICSI (spermatozoïdes macrocéphales, microcéphales, à tête multiple) pourrait diminuer le risque de sélectionner un spermatozoïde avec une chromatine mal condensée. Ceci dit, nous confirmons aussi que d'autres techniques

d'observation et de sélection spermatiques sont nécessaires, comme par exemple l'IMSI pour tenter de désélectionner les spermatozoïdes vacuolés à fort risque aussi de présenter une chromatine mal condensée.

II. Morphologie spermatique et susceptibilité aux dommages de l'ADN (article 4)

Comme nous l'avons déjà envisagé dans nos rappels bibliographiques, les spermatozoïdes dont la chromatine est mal condensée sont plus à risque de fragmentation de l'ADN et de mort (Aitken 2006 ; Oliveira et de Mateo 2010 ; Aitken et Koppers 2011). Dans l'article 1, nous n'avions cependant noté aucune différence significative du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes que ceux-ci soient porteurs ou non d'une large « vacuole » et n'avions donc pas mis en évidence de lien entre la large « vacuole » et la fragmentation de l'ADN spermatique. Il faut cependant noter que dans cette étude, les 15 patients choisis présentaient tous des taux de fragmentation de l'ADN spermatique sur sperme entier, extrêmement faibles (de l'ordre de 3% pour une normale dans notre laboratoire <13%).

Nous avons donc voulu évaluer l'intérêt de l'IMSI dans les spermatozoïdes à ADN très fragmenté. Deux études avaient en effet évoqué l'intérêt de l'IMSI dans cette indication (Hazout et al. 2006 ; Wilding et al. 2011). Ainsi, pour les spermatozoïdes à fragmentation de l'ADN élevée, le statut fragmenté ou non du spermatozoïde a donc été évalué en fonction de la morphologie spermatique (porteurs de « vacuoles » ou pas) et du type de sélection (au grossissement de l'ICSI ou de l'IMSI). Ces résultats sont présentés ci dessous (**article 4**).

Article 4

Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates

Boitrelle F*, Hammoud I*, Ferfour F, Vialard F, Bergère M, Wainer M, Bailly M, Albert M, Selva J.

Andrologia 2013; 45: 163-170.

Pour **8 patients présentant des taux de fragmentation élevés de l'ADN spermatique** (>20% de spermatozoïdes à ADN fragmenté dans le sperme entier; seuil de normalité à 13%), **nous avons comparé les taux de fragmentation de l'ADN (TUNEL *in situ*) des spermatozoïdes en fonction de leur caractère sélectionné ou non et en fonction des modes de sélection.** Ainsi différents types de spermatozoïdes ont été étudiés :

- des spermatozoïdes non sélectionnés provenant du sperme entier (cf. chapitre méthodes)
- des spermatozoïdes sélectionnés par gradient de densité puis sélectionnés comme mobiles (sans se préoccuper de leur morphologie) au grossissement de l'ICSI (x200)
- des spermatozoïdes sélectionnés comme normaux au grossissement de l'ICSI (x200)
- des spermatozoïdes sélectionnés comme normaux au grossissement de l'IMSI (x6300)
- des spermatozoïdes sélectionnés comme morphométriquement normaux mais porteurs de « vacuoles » antérieures au grossissement de l'IMSI (x6300)
- des spermatozoïdes sélectionnés comme morphométriquement normaux mais porteurs de « vacuoles » postérieures au grossissement de l'IMSI (x6300).

Nous avons montré que les spermatozoïdes jugés normaux au grossissement de l'IMSI étaient ceux qui présentaient le taux de fragmentation le plus faible ($4,1 \pm 1,1$ %). Ce taux était significativement plus faible que pour les spermatozoïdes du sperme entier ($26,1 \pm 1,5$ % ; $p < 0,005$), que pour les spermatozoïdes mobiles ($20,8 \pm 2,7$ % ; $p < 0,001$), que pour les spermatozoïdes mobiles, normaux au grossissement de l'ICSI ($18,7 \pm 2,7$ % ; $p < 0,001$) ou encore que pour les spermatozoïdes morphométriquement normaux avec des « vacuoles » antérieures ($15,9 \pm 2,9$ % ; $p < 0,05$) ou postérieures ($22,5 \pm 3,6$ % ; $p < 0,001$) sélectionnés au grossissement de l'IMSI.

En conclusion, pour les patients avec des taux élevés de fragmentation de l'ADN spermatique, les vacuoles sont en lien avec une fragmentation de l'ADN spermatique. Chez ces patients, la sélection en IMSI d'un spermatozoïde morphométriquement normal non porteur de « vacuole » permet une sélection efficace de spermatozoïdes avec un ADN non-fragmenté, plus efficace que celle d'un spermatozoïde normal au grossissement de l'ICSI.

III. Morphologie spermatique et contenu chromosomique (articles 5 et 6)

Nous souhaitons établir ici des liens entre la morphologie et le contenu chromosomique spermatiques.

Dans un premier temps, nous souhaitons savoir si l'IMSI permettait de sélectionner les spermatozoïdes euploïdes. Dans l'article 1, chez des patients à caryotype normal, nous n'avons pas retrouvé de différence significative du taux d'aneuploïdies (X,Y,18) des spermatozoïdes porteurs ou non d'une large « vacuole ». Ceci dit, dans cette étude, le taux d'aneuploïdies des spermatozoïdes porteurs de larges « vacuoles » (n=450) était double de celui des spermatozoïdes non porteurs de « vacuoles » (n=450) (2,2% versus 1,1%). Nous pouvions alors émettre l'hypothèse qu'en incluant un plus grand nombre de spermatozoïdes, des différences significatives pourraient être observées en terme d'aneuploïdies en fonction de la morphologie spermatique. De plus, dans ce même article, sur un petit effectif, nous avons montré que la majorité des spermatozoïdes aneuploïdes porteurs ou non de larges « vacuoles » (n=9/15) présentaient une chromatine mal condensée. Ceci laissait supposer que les spermatozoïdes à contenu chromosomique anormal pourraient mal compacter leur chromatine ou que leur chromatine serait plus susceptible de se décondenser sous l'influence de tel ou tel facteur. D'autres auteurs (Perdrix et al. 2011) ont retrouvé un lien entre la présence de larges « vacuoles » et un risque chromosomique spermatique, risque qu'ils attribuaient à des modifications de l'architecture et de l'organisation longitudinale et spatiale des chromosomes (X,Y et 18) et donc à des modifications de structure de la chromatine (Perdrix et al. 2013). Nous avons donc cherché ici à savoir si l'IMSI pouvait revêtir un intérêt chez les patients présentant des taux élevés de déséquilibres chromosomiques spermatiques, à savoir chez les patients porteurs de translocations réciproques (**article 5**).

Dans un deuxième temps, nous rapportons le cas d'un patient infertile présentant une proportion faible mais non négligeable de spermatozoïdes macrocéphales au spermocytogramme et chez qui le contenu chromosomique spermatique s'est avéré altéré dans la très grande majorité des spermatozoïdes (**article 6**). Ainsi un lien a pu être établi entre un aspect particulier du spermocytogramme (présence de quelques spermatozoïdes macrocéphales) et un risque chromosomique.

Article 5

High-magnification sperm selection does not decrease the aneuploidy rate in patients who are heterozygous for reciprocal translocations.

Chelli H, Ferfour F, **Boitrelle F**, Albert M, Molina Gomes D, Selva J, Vialard F.

JARG 2013; 30: 525-530.

Il existe des « situations à fort risque de déséquilibre chromosomique spermatique », il s'agit des patients porteurs de remaniements chromosomiques. Nous avons donc dans l'article qui suit essayé d'évaluer l'intérêt de l'IMSI chez les patients porteurs de translocations réciproques. Pour répondre à cette question, nous avons inclus 6 patients porteurs de diverses translocations réciproques :

- 1) 46,XY,t(10;13)(10q11;13q34)
- 2) 46,XY,t(8;9)(q21.1;q22.2)
- 3) 46,XY,t(6;10)(p23.q11.2)
- 4) 46,XY,t(4;11)(p15.2;q21)
- 5) 46,XY,t(5;21)(q15;q22.2)
- 6) 46,XY,t(5;8)(p15.1;q22.1))

Pour chaque patient, des spermatozoïdes de morphométrie normale ont été sélectionnés au grossissement de l'ICSI et au grossissement de l'IMSI. Au grossissement de l'IMSI, un spermatozoïde ne devait être porteur que d'au maximum une petite « vacuole » occupant moins de 4% de la surface de la tête pour être considéré comme normal. Pour chaque translocation, une étude de FISH sur spermatozoïdes a été réalisée avec 3 sondes permettant de distinguer tous les types de ségrégation (alterne, adjacente 1, adjacente 2 et 3:1). Les sondes ont été choisies en fonction des chromosomes impliqués dans la translocation.

Nous avons d'abord comparé globalement les pourcentages de spermatozoïdes euploïdes pour 3 types de spermatozoïdes :

- Parmi les spermatozoïdes non sélectionnés du sperme entier : $57,2\% \pm 7,4$ en moyenne des spermatozoïdes sont euploïdes

- Parmi les spermatozoïdes jugés normaux au grossissement de l'ICSI (x 200) : 56,3% \pm 9,4 en moyenne des spermatozoïdes sont euploïdes
- Parmi les spermatozoïdes jugés normaux au grossissement de l'IMSI : 53,7% \pm 10,2 en moyenne des spermatozoïdes sont euploïdes

Globalement, les proportions de spermatozoïdes chromosomiquement équilibrés ne varient pas en fonction de l'existence ou non d'une sélection ni du type de sélection spermatique. L'IMSI ne semble donc pas garantir un statut chromosomique normal. L'IMSI ne permet pas, par rapport à l'ICSI, d'améliorer la sélection des spermatozoïdes chromosomiquement équilibrés chez les patients porteurs de translocation réciproque. Ces résultats sont en accord et complètent les résultats obtenus par une autre équipe (Cassuto et al. 2011). Dans cette étude, chez 9 patients porteurs de translocations Robertsoniennes ou réciproques, il n'a pas été observé de différence du taux de déséquilibre chromosomique des spermatozoïdes observés en IMSI (classification de Barak-Cassuto et classement des spermatozoïdes en 3 classes), comparativement aux spermatozoïdes non sélectionnés du sperme entier.

Cependant, en analysant ces résultats dans le détail, il semblerait qu'il existe des différences entre les translocations. Dans cette étude (**article 5**), nous avons en effet classé les patients en trois groupes en fonction de la similitude de leur profil de ségrégation et de la répartition des taux de ségrégation de type adjacente 1 ; adjacente 2 et 3 :1 (Tableau 2). Pour mémoire, le mode adjacent 1 se caractérise par la ségrégation d'un chromosome normal avec le chromosome non homologue dérivé et le mode adjacent 2 par la ségrégation d'un chromosome normal avec le chromosome homologue dérivé. Le mode 3 :1 aboutit à la formation de gamètes formés de 3 des 4 chromosomes formant le quadrivalent et de gamètes constitués d'un seul des 4 chromosomes du quadrivalent (cf. figure 26).

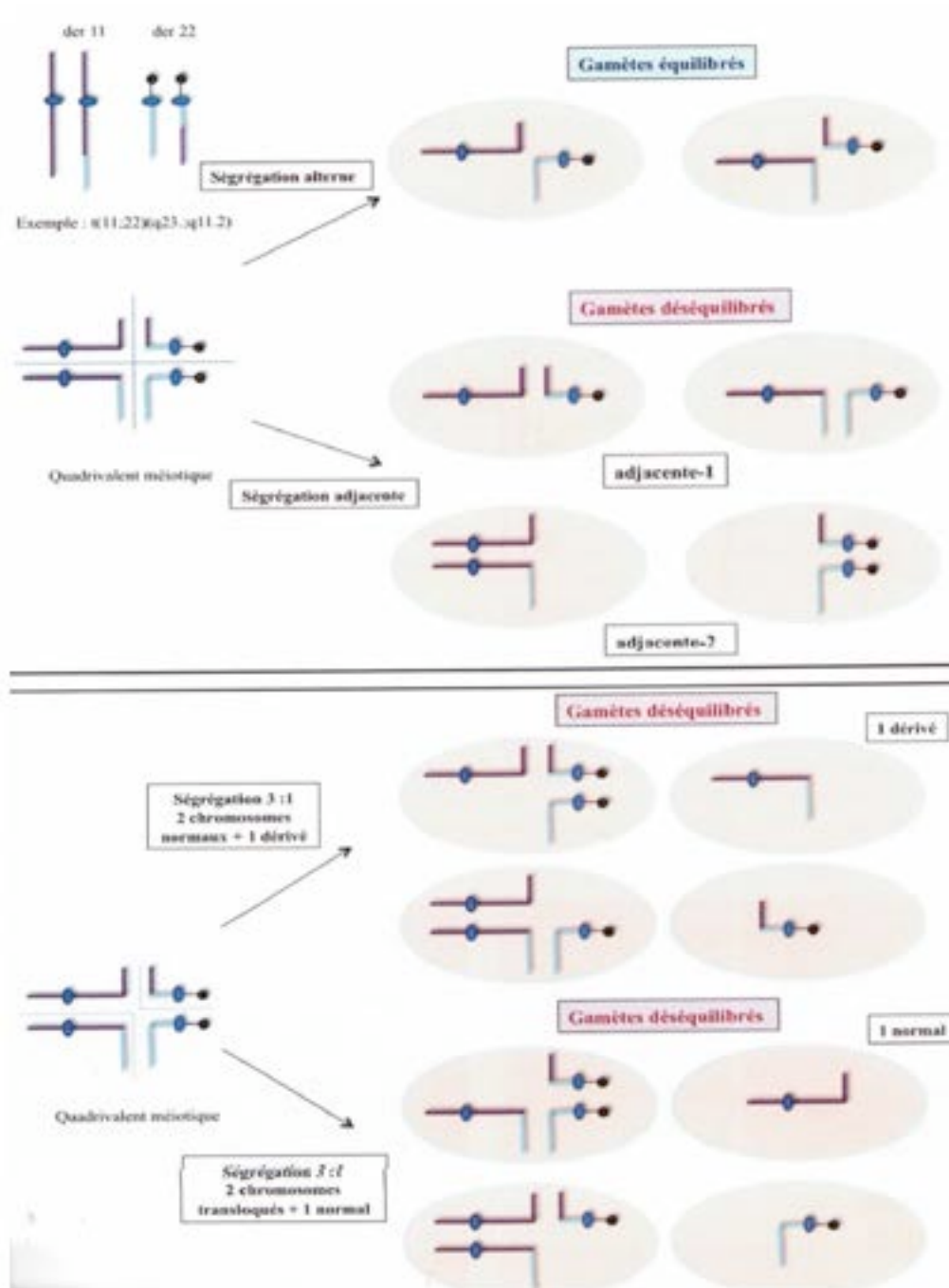


Figure 26: Ségrégation méiotique d'une translocation réciproque. D'après *Camp et al. 2011*.

Profils de ségrégation observés chez les 6 patients	Profils de ségrégation attendus d'après HC forum (base de données des risques cliniques des translocations)	Différences observées entre la sélection spermatique en IMSI et la sélection en ICSI
Groupe 1 (patients 1,2,3) Adjacente 1 > 20% Adjacente 2 < 10%	Mode adjacent 1 le plus fréquent	Aucune différence
Groupe 2 (patients 4 et 5) Adjacente 1 > 20% Adjacente 2 > 10%	Mode adjacent 1 le plus fréquent (patient 4) Mode 3 :1 le plus fréquent (patient 5)	Pas de modification du mode adjacent 1 Diminution du mode adjacent 2 en IMSI Augmentation du mode 3 :1 en IMSI Augmentation des ségrégations aberrantes en IMSI
Groupe 3 (patient 6) 3 :1 > 10%	Mode adjacent 1 le plus fréquent	Pas de modification des modes adjacent 1 et 2 Augmentation des ségrégations aberrantes en IMSI

Tableau 2 : Description des profils de ségrégation méiotique retrouvés chez les 6 patients ayant permis de les classer en trois groupes, description des profils de ségrégation attendus d'après l'analyse HC forum et description des différences obtenues entre les types de sélection « ICSI ou IMSI-like ».

Pour le sous groupe 1, aucune variation significative des proportions des différents types de ségrégations n'ont été observées entre les sélections ICSI et IMSI-like. Pour le sous groupe 2, l'IMSI s'accompagnait par rapport à l'ICSI d'une diminution significative de la ségrégation adjacente 2 ($p < 0.002$) et d'une augmentation des ségrégations de type 3 :1 ($p < 0.05$) ou aberrantes ($p < 0.0001$). Pour le patient 6 du sous groupe 3, la sélection en IMSI s'accompagnait par rapport à l'ICSI d'une augmentation significative des ségrégations aberrantes ($p = 0.04$) (Tableau 2).

Globalement, quand on groupe ces 6 patients, l'IMSI s'accompagne d'une diminution significative de la fréquence de la ségrégation adjacente 2 ($p < 0.0001$) et d'une augmentation significative de la fréquence de la ségrégation 3 :1 ($p < 0.0001$) par rapport à l'ICSI.

Nous avons parallèlement interrogé le site Human Cytogenetics forum. Le site HC forum est une base de données d'aide au conseil génétique répertoriant entre autres les translocations. Pour chaque translocation, les différents modes de ségrégations sont détaillés et pour chacun est calculé un risque théorique de viabilité et d'observation à la naissance. Il est intéressant de noter que d'après notre analyse sur HC forum (présentée en annexe) pour les translocations des patients 1,2,3,4 et 6, le mode de ségrégation le plus probable était le mode adjacent 1. De par sa fréquence, il n'est pas surprenant que les spermatozoïdes issus du mode de ségrégation adjacent 1 ne soient pas désélectionnés en IMSI. Pour le patient 5, le mode de ségrégation potentiellement viable et le plus probable était le mode 3 :1. Ceci signifie que pour le patient 5, les spermatozoïdes issus des ségrégations 3 :1 sont potentiellement fréquents et féconds physiologiquement. Il n'est donc pas surprenant que les spermatozoïdes issus des ségrégations 3 :1 ne soient pas désélectionnés en IMSI chez ce patient.

Par contre d'après nos résultats, l'IMSI (contrairement à l'ICSI) permettrait de désélectionner les spermatozoïdes issus des ségrégations adjacentes 2. Ce type de ségrégation ne modifie pas le nombre des chromosomes mais leur structure. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que la structure chromatinienne des spermatozoïdes issus des ségrégations adjacentes 2 serait perturbée et que ces anomalies structurales pourraient prendre la forme de « vacuoles ». Ainsi la sélection de spermatozoïdes normaux non porteurs de vacuole ou porteurs d'une seule petite vacuole en IMSI permettrait de diminuer le risque de sélectionner un spermatozoïde issu d'une ségrégation adjacente 2. Cependant, cela ne permet pas d'expliquer la « sur-représentation » des spermatozoïdes issus des ségrégations 3 :1 (ou aberrantes pour le patient 6) dans le groupe de spermatozoïdes sélectionnés au grossissement de l'IMSI (par rapport à ceux sélectionnés au grossissement de l'ICSI). Ces ségrégations 3 :1 et aberrantes modifient le nombre de chromosomes. La chromatine des spermatozoïdes issus de ces ségrégations se compacterait-elle mieux que celle des spermatozoïdes issus des ségrégations adjacentes 1 et 2 ? Les différences observées sont elles plus simplement dues au faible nombre de patients inclus ? au plus faible nombre de spermatozoïdes sélectionnés en IMSI, comparé

à l'ICSI (un total de 282 spermatozoïdes sélectionnés en IMSI pour les patients 4,5,6 vs. 440 spermatozoïdes sélectionnés en ICSI). Est-ce que la taille des chromosomes impliqués dans les remaniements a une influence sur la morphologie spermatique ? Peut être aurait-il fallu sélectionner des spermatozoïdes morphométriquement normaux non porteurs de vacuoles (c'est à dire exclure ceux présentant une petite vacuole) pour conclure ? Peut être faudrait-il analyser chaque translocation à part en ne groupant que les patients porteurs d'une même translocation ?...autant de questions auxquelles nous n'avons pas (encore) la réponse.

Des études sont donc à mener sur un plus grand nombre de patients et de spermatozoïdes (de morphologies variées, non porteurs de « vacuole », porteurs de petites ou de larges « vacuoles ») pour affiner la compréhension des liens qui pourraient exister (ou ne pas exister) entre la présence de larges ou de petites « vacuoles » d'une part et un contenu chromosomique particulier ou un mode de ségrégation particulier d'autre part.

D'un autre côté, certaines anomalies morphologiques spermatiques sont connues pour être en lien avec des anomalies du contenu chromosomique. Il s'agit des macrocéphalies spermatiques. Brièvement, il existe **deux grands cadres** quand on parle de spermatozoïde macrocéphale. **Le syndrome de macrocéphalie** proprement-dit correspond à un phénotype décrit pour la première fois par Nistal en 1977. Ce syndrome est caractérisé par la présence de spermatozoïdes dont la largeur et la longueur sont augmentées et dont le volume de la tête spermatique est de ce fait, aussi augmenté. Ces spermatozoïdes macrocéphales ont la particularité d'être en très grand nombre dans certains de ces spermes (d'où le terme de syndrome) et de présenter des anomalies flagellaires à type de flagelle multiple. Dans ce syndrome, une relation entre le phénotype spermatique et le contenu chromosomique a été décrite, avec polyploïdie des spermatozoïdes macrocéphales (Yurov et al. 1996 ; Bernardini et al. 1998 ; Weissenberg et al. 1998 ; Devillard et al. 2002). Cependant les quelques spermatozoïdes normaux retrouvés dans ce syndrome, seraient eux aussi porteurs d'anomalies chromosomiques. Une mutation homozygote pour le gène de l'aurora kinase C (AURKC) a été identifiée à l'origine de ce syndrome (Dieterich et al. 2007). Récemment une autre mutation de ce gène a été décrite (Ben Khelifa et al. 2011). Ce gène de l'AURKC, localisé à l'extrémité du bras long du chromosome 19 code pour une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille Aurora, impliquée dans la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire lors de la méiose (pour revue voir Guichaoua et al. 2009).

En dehors de cette situation syndromique, quelques spermatozoïdes macrocéphales peuvent être retrouvés dans un sperme aux caractéristiques qui peuvent être normales par ailleurs. Dans ce cadre, les spermatozoïdes macrocéphales ne présentent généralement pas d'anomalies flagellaires. Il a déjà été montré (Achard et al. 2007) que chez 4 patients présentant 19%, 22%, 29,5%, et 49,7% de spermatozoïdes macrocéphales dans le sperme, de plus nombreux spermatozoïdes étaient aneuploïdes (respectivement 25,6%, 43,6%, 51,4% et 71,7%). Cela leur permettait d'émettre l'hypothèse que dans ces « spermes avec macrocéphalie » même les spermatozoïdes de morphologie normale pouvaient être aneuploïdes. Dans cet article, les auteurs avaient fixé une limite à 20% de spermatozoïdes macrocéphales au spermocytogramme (Achard et al. 2007), limite au-dessus de laquelle une analyse FISH était conseillée. Dans l'article 6 présenté ci-dessous, nous estimons que ce seuil pourrait être revu à la baisse.

Article 6

FISH studies counter-indicated A.R.T with patient's semen despite a semen with only 12% of enlarged heads: a case report.

Guthauser B, **Boitrelle F**, Albert M, Ketata F, Meynant C, Selva J, Vialard F.

Syst Biol Reprod Med 2013; 59: 214-217.

Chez un patient présentant **12% de spermatozoïdes macrocéphales** au spermocytogramme, **deux fausses couches spontanées précoces post insémination intra-utérine** chez sa conjointe nous ont amené à **pousser un peu plus loin nos analyses spermatiques**. Chez ce patient, nous avons été « surpris » de retrouver **des taux d'aneuploïdies spermatiques très élevés (78% des spermatozoïdes)**. Ce taux était si élevé (et ce en n'étudiant que 3 chromosomes) qu'il nous a amené à contre indiquer une AMP intraconjugale et à conseiller le recours au don de sperme ou à l'adoption. Ceci souligne donc la très grande diversité du « syndrome de macrocéphalie spermatique ». Même s'il s'agit ici d'un seul cas, le cut-off de 20% de spermatozoïdes macrocéphales avancé par certains auteurs comme valeur limite au-delà de laquelle des investigations en FISH sont nécessaires, gagnerait peut être à être revu à la baisse.

Quoiqu'il en soit, nous avons établi un lien entre un aspect particulier du spermocytogramme (présence de quelques spermatozoïdes macrocéphales) et un risque chromosomique pour l'ensemble des spermatozoïdes du sperme (même ceux de morphologie normale). Etant donné le risque élevé d'anomalies chromosomiques spermatiques, la morphologie spermatique ne pouvait pas être ici un « bon » moyen de sélection des spermatozoïdes euploïdes et toute tentative d'AMP intra-conjugale était contre-indiquée.

PARTIE 2

Applications cliniques

Dans la première partie du chapitre résultats, nous avons établi des liens entre des aspects morphologiques du spermatozoïde tels qu'on peut les observer au grossissement de l'IMSI et des marques épigénétiques ou une susceptibilité aux dommages de l'ADN. Forts de ces résultats, nous pensions alors dégager de nouvelles indications d'IMSI. Dans cette deuxième partie du chapitre résultats, nous essaierons donc de répondre à ces questions : L'IMSI donne-t-elle de meilleurs résultats que l'ICSI ? Dans quelles indications ? Dans quelles pathologies spermatiques ?

Dans cette deuxième partie, nous traiterons d'abord d'une des applications cliniques de l'IMSI. Pour les spermatozoïdes très altérés (diminution importante de la numération spermatique ou risque d'altération), la congélation de sperme est une pratique courante en AMP, c'est pour cette raison que nous voulions connaître ses effets éventuels sur les spermatozoïdes en terme de morphologie (telle qu'elle peut être observée en MSOME) et de qualité nucléaire (**article 7**). En tenant compte des résultats de cette étude et de l'ensemble de nos résultats, nous listerons ensuite les principales indications d'IMSI telles qu'elles peuvent se dégager aujourd'hui (**article 8**).

I. IMSI et congélation spermatique (article 7)

La congélation spermatique est une pratique quasi-quotidienne en AMP, notamment dans les indications princeps de l'ICSI à savoir l'oligospermie sévère et l'asthénozoospermie isolées ou combinées. Cependant la congélation de sperme peut aussi être utilisée dans le cadre du don d'ovocyte où le sperme du conjoint (qui peut être normal) est congelé pour éviter que la donneuse et le conjoint receveur ne se rencontrent le jour de la ponction ainsi que pour éviter la rencontre des hommes des couples receveurs. La congélation/décongélation spermatique est connue pour induire une diminution de la vitalité et de la mobilité spermatiques. Ceci-dit, les questions auxquelles nous souhaitions répondre étaient: est-ce qu'un spermatozoïde mobile ayant "survécu" après congélation/décongélation présente une bonne qualité nucléaire? Une bonne morphologie en MSOME ? et le MSOME permet-il alors de mieux sélectionner les spermatozoïdes congelés/décongelés? (**article 7**).

Article 7

Cryopreservation of human spermatozoa alters motile sperm organelle morphology, decreases the number of top spermatozoa and induces nuclear vacuolisation and chromatin decondensation

Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergère M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J

J Androl 2012; 33: 1371-1378

Chez **25 patients infertiles** aux caractéristiques spermatiques variées, nous avons alors évalué avant et après congélation/décongélation (congélation lente):

- la morphologie spermatique en MSOME selon les critères de Vanderzwalmen précédemment cités
- la vitalité spermatique et
- la condensation de la chromatine spermatique par coloration des spermatozoïdes au bleu d'aniline acétifié.

D'après notre analyse de la littérature, **c'était la première fois** ici que les effets du processus de congélation/décongélation spermatique sur la morphologie des spermatozoïdes mobiles à fort grossissement étaient évalués. Une étude Toulousaine a suivi en 2013 (Gatimel et al. 2013).

Dans notre étude, nous avons montré que **la congélation/décongélation spermatique induisait une vacuolisation spermatique avec une augmentation des spermatozoïdes de grade III** (morphométriquement normaux mais porteurs d'une large « vacuole » ou de plus de deux petites « vacuoles ») **et IV** (de morphologie anormale avec ou sans « vacuole ») **et une diminution parallèle des spermatozoïdes de grade I** (morphométriquement normaux sans « vacuole ») **et II** (morphométriquement normaux mais porteurs de une ou deux petites « vacuoles » occupant moins de 4% de la surface de la tête chacune). **La congélation/décongélation spermatique induisait une diminution de la vitalité spermatique. Elle induisait aussi une décondensation de la chromatine** (augmentation de la proportion de spermatozoïdes marqués par le bleu d'aniline).

La congélation/décongélation spermatique induit donc une vacuolisation et une « décondensation » de la chromatine. Ceci-dit, dans notre étude, ce sont des populations

spermatiques différentes qui ont été observées avant et après congélation/ décongélation. De plus comme la condensation de la chromatine est corrélée à la vitalité, il aurait été intéressant d'étudier la condensation de la chromatine des seuls spermatozoïdes demeurant vivants ou mobiles après congélation/décongélation. Finalement, la technique de congélation utilisée ici est une des techniques utilisables ; sans doute des résultats différents pourraient être obtenus avec d'autres méthodes de congélation. En effet, Gianaroli et al. (2012) pencheraient eux en faveur de la vitrification ou de la lyophilisation spermatique puisqu'elle induirait moins de dommages spermatiques que la congélation classique. **Quoiqu'il en soit, d'après notre étude, la congélation ne semble pas si « inoffensive » que cela sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation (induction d'une « vacuolisation »), en tous cas chez les patients infertiles. Ces résultats sont toutefois à confirmer sur une plus grande population de patients.** L'équipe de Toulouse (Gatimel et al. 2013a) est, elle parvenu à des résultats différents chez 27 patients fertiles. Ils n'ont en effet pas retrouvé de différences après congélation/décongélation en terme de surface totale occupée par les vacuoles, de position des vacuoles ni en termes de proportion de spermatozoïdes porteurs de petites ($\leq 6.5\%$) ou de larges vacuoles ($>13\%$) des spermes congelés/décongelés comparativement aux sperme frais. Dans cette étude, le protocole de congélation utilisé était semblable au nôtre. Par contre, ils ont congelé directement le sperme frais alors que nous avons congelé la fraction migrée (obtenue après gradient de densité). De plus, dans l'étude de Gatimel et al. les patients inclus étaient fertiles contrairement aux nôtres qui étaient infertiles. On peut alors émettre deux hypothèses: 1) celle d'une différence de susceptibilité au processus de congélation/décongélation, des spermatozoïdes migrés par rapport aux spermatozoïdes frais « baignant » dans le liquide séminal et 2) celle d'une différence de susceptibilité au processus de congélation/décongélation des spermatozoïdes en fonction de leur « provenance » (hommes infertiles ou fertiles).

Au total, d'après nos résultats, le potentiel intérêt de l'IMSI dans la sélection des spermatozoïdes mobiles décongelés mérite d'être évalué.

II. Indications et résultats de l'IMSI (article 8)

En intégrant l'ensemble des résultats décrits jusqu'ici et en analysant la littérature, nous avons écrit une revue bibliographique sur les principales indications d'IMSI en 2014 (article 8).

Article 8

High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: confirmed and potential indications. A literature review.

Boitrelle F, Guthauser B, Alter L, Bailly M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J
Reprod biomed online 2014 ; 28: 6-13.

Cette revue fait le point sur un peu plus de 10 ans de pratique d'IMSI. Aujourd'hui en s'appuyant sur nos résultats et ceux de la littérature, la principale (et la seule) indication d'IMSI que l'on peut retenir sans équivoque est : les échecs répétés d'implantation embryonnaire post-ICSI. En effet plusieurs études randomisées incluant de large effectifs de patients concourent à décrire l'IMSI comme intéressante en terme de grossesses dans les échecs d'implantation embryonnaire en ICSI.

Pour l'équipe de Bartoov, l'IMSI permettrait d'augmenter les taux de grossesses et de diminuer les taux de fausses couches spontanées chez les couples ayant réalisé préalablement au moins deux tentatives d'ICSI sans succès (Bartoov et al. 2003). Hazout et al. (2006) parviennent aux mêmes conclusions chez des patientes de même profil et précisent qu'ils ne notent aucune différence en terme de taux de fécondation, ni en terme de qualité embryonnaire à J2 entre les embryons issus d'IMSI et les embryons issus d'ICSI. En 2008, l'équipe d'Antinori publie la première étude randomisée, dans laquelle les résultats de 227 tentatives d'IMSI sont comparés aux résultats de 219 ICSI. Le taux de grossesse clinique en IMSI est supérieur au taux de grossesse clinique obtenu en ICSI (39,2 % vs 26,5 %) et ce notamment chez les couples en échec d'ICSI pour lesquels l'IMSI permet de réduire les taux de fausses couches spontanées de 20% (Antinori et al. 2008). Plus récemment, une autre étude randomisée (Klement et al. 2013) confirme que l'IMSI pourrait être indiquée dans les échecs d'implantation en ICSI, voire qu'elle

pourrait revêtir un intérêt après un seul échec d'ICSI. Mais alors à partir de combien d'échecs de tentatives d'ICSI, l'IMSI pourrait-elle être proposée? A partir de 1 échec (Klement et al. 2013), 2 échecs (Berkovitz et al. 2006), plus ? La réponse n'est pas si claire que cela. Ce d'autant que d'autres études ont montré l'absence de supériorité de l'IMSI sur l'ICSI (Leandri et al. 2013 ; De Vos et al. 2013). Notons toutefois que dans ces deux études, ce sont essentiellement de tentatives de rang 1 qui ont permis de comparer IMSI et ICSI. L'analyse de la littérature est en fait très compliquée. Les études analysent des tentatives d'ICSI et d'IMSI de rang différent, des patients aux caractéristiques spermatiques variées, des classifications des anomalies observées différentes, des définitions de grossesses cliniques différentes...etc. D'ailleurs, en analysant la même littérature à quelques mois d'intervalle, une autre revue conclut à l'absence d'intérêt de l'IMSI (Teixeira et al. 2013). Même si cette étude est une étude Cochrane, elle est critiquable au sens où elle regroupe toutes les publications sans tenir compte des spécificités de chacune en terme de rang de tentative par exemple... D'autres études randomisées sur le rang de la tentative, l'âge maternel et les caractéristiques spermatiques notamment permettront peut être de déterminer de potentielles indications d'IMSI.

L'IMSI pourrait aussi revêtir un intérêt particulier chez les patients présentant une tératozoospermie sévère (Antinori et al. 2008 ; Balaban et al. 2011). Cependant, le seuil de tératozoospermie pour lequel l'IMSI est indiquée n'est pas déterminé. Pour Bartoov et al. (2002) en deçà de 20% de spermatozoïdes typiques en MSOME, aucune grossesse ne serait obtenue en ICSI. Pour Berkovitz et al. chez 66 couples dont l'homme présente une nucléo-tératozoospermie (<7% de spermatozoïdes typiques en MSOME), les taux de grossesses sont plus élevés en IMSI (43%) par rapport à l'ICSI (3%). L'IMSI n'apporte pas de bénéfice chez les 26 couples sans nucléo-tératozoospermie (Berkovitz et al. 2006). Plus récemment, l'équipe de Bondy a déterminé un seuil de 10% de spermatozoïdes typiques au spermocytogramme (classification de David modifiée) devant faire préférer l'IMSI à l'ICSI (El Khattabi et al. 2013). Les seuils sont donc différents selon les équipes. Selon certaines équipes dont la nôtre, l'IMSI pourrait aussi être indiquée même si le pourcentage de formes typiques du sperme est inférieur à 1%, pour parvenir à choisir le spermatozoïde le plus normal ou le moins atypique possible.

L'IMSI pourrait aussi être indiquée chez les patients présentant des taux élevés de fragmentation de l'ADN spermatique (Hazout et al. 2006 ; Wilding et al. 2011).

Finalement, d'après nos résultats et ceux d'autres équipes, d'autres indications sont à investiguer. Il s'agit notamment

- des spermatozoïdes pour lesquels la non-condensation de la chromatine est élevée
- les spermatozoïdes congelés/décongelés
- mais aussi des indications féminines. En effet, comme nous l'avons noté dans cet article 8, les femmes âgées dont les ovocytes présenteraient des capacités de réparation altérées pourraient selon certains auteurs bénéficier de l'IMSI. L'IMSI permettrait en effet de mieux sélectionner le spermatozoïde en termes de qualité nucléaire et de diminuer en quelque sorte le « travail » de l'ovocyte...

En conclusion, la technique d'IMSI telle que nous l'utilisons (avec un objectif à sec, à température ambiante, avec présélection des spermatozoïdes en moins d'une heure et injection des ovocytes par un deuxième opérateur quand 2 spermatozoïdes ou plus sont sélectionnés) ne semble pas présenter d'inconvénients en terme d'altération des spermatozoïdes ou de stockage trop long des ovocytes avant injection. L'utilisation d'un objectif x100 à sec permet aussi d'améliorer largement la faisabilité de la technique et de diminuer le temps nécessaire. Dans notre équipe, le bilan pré-IMSI comprend un MSOME, une évaluation de la condensation chromatinienne, une évaluation de la fragmentation de l'ADN mais aussi une FISH spermatique si ce bilan est fait dans le cadre d'échecs d'implantation embryonnaire récurrents. Au terme de ce bilan, l'indication d'IMSI est discutée. Ainsi, l'IMSI nous paraît être un outil à réserver à certaines indications, certes, indications qui restent à déterminer, certes, mais à ne pas négliger.

Discussion

Pour évaluer une technique de sélection des gamètes en AMP, il y a deux démarches complémentaires. La première consiste à réaliser des essais comparatifs des 2 techniques dans divers groupes de patients pour déterminer la technique la plus efficace. Le choix des groupes sera ici déterminant et la réponse à la question posée ne s'appliquera qu'aux groupes étudiés. La deuxième démarche, plus analytique, consiste tout d'abord à comprendre ce qu'on sélectionne pour en déduire ensuite les indications de la technique. C'est cette deuxième démarche que nous avons suivie ici. Notre principal objectif était d'établir des liens entre la **morphologie du spermatozoïde humain vivant** d'une part, et les **marques épigénétiques, la qualité de l'ADN, le statut chromosomique et les capacités fécondantes spermatiques** d'autre part. Ces liens devaient alors nous permettre d'atteindre notre deuxième objectif, à savoir de **déterminer les critères de choix « du spermatozoïde »**, celui dont l'injection intra-ovocytaire présenterait le moins de risques d'échec d'implantation embryonnaire ou d'anomalies pour la descendance.

Morphologie spermatique et marques épigénétiques

Chez des hommes infertiles aux caractéristiques spermatiques normales mais présentant des taux élevés de non-condensation de la chromatine dans le sperme, **nous avons montré que la morphologie des spermatozoïdes était en lien avec des anomalies de condensation de la chromatine et donc avec des marques épigénétiques particulières.** Cette anomalie de la condensation chromatinienne n'est pas spécifique d'une morphologie particulière mais pour la première fois ici, des liens morpho-fonctionnels précis sont établis pour chaque type morphologique de spermatozoïde. **Par exemple, des taux élevés (>80%) de non-condensation de la chromatine sont retrouvés pour les spermatozoïdes macrocéphales, microcéphales et à tête multiple.** De plus, un spermatozoïde « vacuolé » sur 2 mais également un spermatozoïde de morphologie normale sur 5 peuvent présenter une non-condensation de la chromatine. Notons quand même que ces liens ont été mis en évidence sur des spermatozoïdes fixés, non injectables (article 3).

De façon plus intéressante cliniquement, **ces mêmes liens ont été établis pour des spermatozoïdes vivants mobiles et donc potentiellement injectables.** L'IMSI représente un investissement en termes de matériel et de temps mais elle est utile pour le

choix des spermatozoïdes. Nous avons en effet montré que la chromatine des spermatozoïdes porteurs d'une large « vacuole » (**article 1**) et que celle des spermatozoïdes porteurs de plus de deux petites « vacuoles » (**article 2**) s'avérait plus fréquemment non condensée (marquage au bleu d'aniline marquant les histones) que celle des spermatozoïdes non porteurs de « vacuoles ». **Ainsi la « vacuole » (petite ou large) est de nature nucléaire, en lien avec un statut épigénétique particulier (une non-condensation) de la chromatine (pour revue, articles 9 et 10 présentés en annexe).** Ce lien a été retrouvé par d'autres auteurs en ce qui concerne les larges « vacuoles » (Garolla et al. 2008 ; Perdrix et al. 2011 ; Franco et al. 2012) mais c'est la première fois ici qu'il est aussi décrit pour les petites vacuoles. Notons que nous utilisons les guillemets pour décrire les « vacuoles », puisque nos résultats nous ont amenés à la décrire plutôt comme une concavité nucléaire dépourvue d'ADN, que comme une « vacuole » proprement dite. Nous pouvons proposer l'hypothèse que cette concavité nucléaire (ou ce puits nucléaire en ce qui concerne les petites « vacuoles ») pourrait contenir « quelque chose » comme le ferait une vacuole mais ce « quelque chose » reste à déterminer.

Quoiqu'il en soit, comme nous l'avons rappelé la mauvaise condensation de la chromatine et la persistance d'histones dans la tête du spermatozoïde sont des facteurs délétères pour l'embryon en termes de développement tardif et de potentiel implantatoire (cf. rappels bibliographiques). Ces histones persistantes et les modifications biochimiques de ces histones sont vectrices, on l'a vu, d'une information épigénétique. De plus, il a été montré que les histones spermatiques n'étaient pas distribuées au hasard le long du génome mais situées au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Hammoud et al. 2011). Ainsi, on peut très bien envisager que les spermatozoïdes « vacuolés », présentant plus d'histones persistantes que les spermatozoïdes sans vacuole soient « étiquetés » comme « épigénétiquement défavorables » au développement embryonnaire.

L'étude de la morphologie spermatique et l'éviction de certaines anomalies spermatiques repérables au cours de l'ICSI (spermatozoïdes macrocéphales, microcéphales, à tête multiple) pourrait diminuer le risque de sélectionner un spermatozoïde avec une chromatine mal condensée. Cependant certaines anomalies comme les « vacuoles », et notamment les plus petites d'entre elles, ne sont pas toujours vues au grossissement classique de l'ICSI (x400). L'IMSI présente, alors, l'avantage de désélectionner les spermatozoïdes vacuolés à fort risque de présenter une chromatine mal condensée et donc

« épigénétiquement défavorables » au développement embryonnaire. **Ainsi, le potentiel intérêt de l'IMSI par rapport à l'ICSI en termes de blastulation, de grossesses et d'accouchements démontrée par plusieurs équipes (pour revue, article 8 et article 14 présenté en annexe) pourrait trouver une explication dans la nature « épigénétiquement chromatinienne » des « vacuoles » observées.**

Très récemment, l'équipe de Cassuto et al. (2014) a montré que l'IMSI pourrait revêtir un intérêt dans la réduction des malformations majeures à la naissance. En effet dans cet article, ils ont analysé rétrospectivement les naissances post IMSI et les ont comparées aux naissances post-ICSI. Chez 1028 bébés nés (450 post IMSI et 578 post-ICSI), ils ont montré qu'il existait une moins grande proportion de malformations majeures en IMSI (6/450, 1,33% en IMSI versus 22/578, 3,80% en ICSI; $P=0.014$). Les malformations pouvaient être musculosquelettiques, cardiaques, faciales.... Mais elles concernaient le plus souvent l'appareil génital masculin (hypospadias et cryptorchidie notamment). D'après d'autres études (pour revue voir Vega et al. 2012), l'incidence de ces anomalies est connue pour être sous influence environnementale (perturbateurs endocriniens) et probablement au moins en partie liée à ce qu'on appelle l'épigénétique. **Ainsi on pourrait émettre l'hypothèse que l'IMSI permettrait de sélectionner le spermatozoïde le moins épigénétiquement défavorable c'est-à-dire LE spermatozoïde qui présenterait le moins de risque d'échec d'implantation embryonnaire mais aussi celui qui présenterait le moins de risque d'anomalies pour la descendance.** Comme nous le verrons, l'utilisation de modèles animaux nous permettra, nous l'espérons de tester cette hypothèse.

Morphologie spermatique et qualité de l'ADN

Les larges vacuoles ne seraient pas en lien avec la fragmentation de l'ADN chez les patients présentant des taux faibles de fragmentation de l'ADN spermatique (**article 1**). **Cependant, pour les patients avec des taux élevés de fragmentation de l'ADN spermatique, la sélection d'un spermatozoïde normal sans « vacuole » en IMSI permet une sélection efficace de spermatozoïdes avec un ADN non-fragmenté ; les spermatozoïdes vacuolés et les spermatozoïdes sélectionnés comme normaux au grossissement de l'ICSI étant significativement plus fragmentés (article 4).**

Nous pouvons alors émettre 2 hypothèses. La première est que les vacuoles pourraient être le témoin d'une fragmentation de l'ADN ou d'une non-condensation de la chromatine sans qu'il y ait de lien entre ces 2 anomalies. La seconde hypothèse qui est celle que nous avons retenue, est qu'il y aurait un lien entre la non-condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. En faveur de cette hypothèse, il a déjà été montré que certains spermatozoïdes dont la chromatine était mal condensée avaient une susceptibilité accrue aux dommages de l'ADN comme par exemple à la fragmentation de l'ADN (Aitken 2006 ; Oliveira et de Mateo 2010 ; Aitken et Koppers 2011) ; l'inverse n'étant pas vrai. Ainsi, même si la nature des « vacuoles » est nucléaire et en lien avec des marques épigénétiques particulières (non condensation de la chromatine), dans certaines conditions, l'ADN spermatique peut se fragmenter et les « vacuoles » être alors en lien avec une fragmentation de l'ADN. **Chez les patients présentant des taux élevés de fragmentation de l'ADN spermatique, l'IMSI pourrait donc revêtir un intérêt particulier (supérieur à l'ICSI) en sélectionnant les spermatozoïdes normaux non porteurs de « vacuoles » et ayant plus de chances de présenter un ADN intact (non fragmenté).**

Deux études ont d'ailleurs évoqué l'intérêt de l'IMSI dans cette indication (Hazout et al. 2006 ; Wilding et al. 2011). Comme il a déjà été montré que le développement embryonnaire tardif et le potentiel implantatoire des embryons issus de l'injection d'un spermatozoïde à ADN fragmenté étaient moins bons que celui des embryons issus de spermatozoïdes à ADN intact (cf. rappels bibliographiques), **la potentielle supériorité de l'IMSI sur l'ICSI en terme de grossesses évolutives chez les patients présentant des taux élevés de fragmentation de l'ADN spermatique pourrait trouver une explication dans la susceptibilité des spermatozoïdes vacuolés aux dommages de l'ADN.** Il reste cependant à déterminer les circonstances dans lesquelles cette susceptibilité spermatique aux dommages est accrue, pour tenter de les prendre en charge avant toute tentative d'AMP. De plus comme nous l'avions noté dans l'article 8, si la qualité nucléaire des spermatozoïdes est altérée (et non améliorable) et que la femme est âgée (plus de 37 ans), l'IMSI donnerait quand même plus de grossesses que l'ICSI en sélectionnant le « spermatozoïde de meilleure qualité nucléaire » « donnant alors le moins de travail à l'ovocyte » dont les capacités de réparation sont altérées (pour revue voir article 8 et article de Setti et al. 2013).

Morphologie spermatique et contenu chromosomique

Nous avons aussi montré que certains aspects morphologiques des spermatozoïdes pouvaient être en lien avec des anomalies chromosomiques. Les spermatozoïdes macrocéphales, même en faible nombre peuvent en effet être chromosomiquement anormaux. Mais, plus intéressant, même les spermatozoïdes de morphologie normale provenant d'un sperme contenant un pourcentage faible de spermatozoïdes macrocéphales peuvent présenter un contenu chromosomique anormal (**article 6**). Ainsi nous avons établi un **lien entre un aspect particulier du spermocytogramme (présence de quelques spermatozoïdes macrocéphales) et un risque chromosomique pour l'ensemble des spermatozoïdes du sperme (même ceux de morphologie normale).** Etant donné le risque élevé d'anomalies chromosomiques spermatiques, la morphologie spermatique ne pouvait pas être ici un « bon » moyen de sélection des spermatozoïdes euploïdes et toute tentative d'AMP intra-conjugale était contre-indiquée. De plus, dans le cas du syndrome de macrocéphalie proprement dit, notre équipe avait précédemment évalué l'intérêt de la sélection en ICSI et en IMSI de spermatozoïdes de morphologie normale (Chelli et al. 2010). Chez deux patients présentant respectivement 94 et 96% de spermatozoïdes macrocéphales, ni la sélection ICSI-like de spermatozoïdes de morphologie normale, ni la sélection IMSI-like de spermatozoïdes de morphologie normale sans vacuoles ou porteurs d'une seule petite vacuole (occupant moins de 4% de la surface de la tête) ne permettait de sélectionner des spermatozoïdes au contenu chromosomique normal. En conclusion en cas de macrocéphalie spermatique (syndromique ou non), aucune méthode de sélection spermatique ne permet aujourd'hui de garantir un statut chromosomique normal.

En ce qui concerne les spermatozoïdes porteurs de larges vacuoles, **chez les patients avec un caryotype normal, nous n'avons pas retrouvé de lien entre la présence d'une large vacuole et un contenu chromosomique anormal (article 1)** contrairement à d'autres équipes (Garolla et al. 2008 ; Perdrix et al. 2011). Ceci-dit dans l'article 1, les patients présentaient des taux faibles d'aneuploïdie spermatique dans le sperme entier et les aneuploïdies étaient certes non significativement différentes dans les spermatozoïdes vacuolés comparativement aux non porteurs de vacuoles, mais toutefois deux fois plus fréquentes. Nous avons alors essayé d'évaluer les taux de déséquilibres chromosomiques retrouvés dans les spermatozoïdes de patients à « risque », c'est à dire des patients porteurs de remaniements chromosomiques. **Chez 6 patients porteurs de translocations**

réciproques (et donc à fort risque de présenter des anomalies chromosomiques spermatiques), nous avons montré que l'IMSI et la sélection de spermatozoïdes de morphologie normale sans vacuole (ou porteur d'une seule petite vacuole) ne garantissait pas (pas plus que l'ICSI) de sélectionner un spermatozoïde avec un contenu chromosomique normal (article 5). Des résultats concordants ont été retrouvés par l'équipe de Cassuto (2011) pour des patients porteurs de translocations Robertsonniennes et réciproque (14 patients). **Comme nous l'avions précédemment discuté, une translocation réciproque ne se comporte pas comme une autre en terme de profils de ségrégation et les sélections ICSI et IMSI-like de spermatozoïdes de morphologie normale s'accompagnaient de profils de ségrégation différents.** D'autres études sont donc à mener sur un plus grand nombre de patients porteurs de translocations réciproques et de spermatozoïdes (de morphologies variées, non porteurs de « vacuole » et porteurs de petites ou larges « vacuoles ») pour affiner la compréhension des liens qui pourraient exister (ou ne pas exister) entre la présence de larges ou de petites « vacuoles » d'une part et un contenu chromosomique anormal ou un mode de ségrégation particulier d'autre part.

Morphologie spermatique et capacités fécondantes

Pour féconder un ovocyte, le spermatozoïde doit physiologiquement avoir réalisé sa réaction acrosomique. De plus, pour Mozorumi et Yanagimachi (2005) l'injection intra-ovocytaire de l'acrosome (d'un spermatozoïde avec un « acrosome non réagi ») serait délétère pour le développement embryonnaire. **C'est pour cette raison que nous avons décidé d'étudier le statut acrosomique des spermatozoïdes porteurs de « vacuoles » (larges ou petites) et de comparer ce statut à celui des spermatozoïdes non porteurs de « vacuole ».** Nous avons montré que les vacuoles n'étaient pas en lien avec le statut « réagi » ou « non réagi » de l'acrosome (article 1 et 2). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres équipes. Magli et al. (2012) en utilisant le polscope, ont montré que les « vacuoles » n'étaient pas en lien avec le statut acrosomique des spermatozoïdes. De plus, Gatimel et al. (2013b) grâce à l'étude des spermatozoïdes de 2 patients globozoospermes, avancent des arguments solides en faveur de l'origine non acrosomale des « vacuoles ». Cependant 2 équipes (Kacem et al. 2010 ; Montjean et al. 2012) ont

observé parallèlement un taux de spermatozoïdes réagis plus important et un taux de spermatozoïdes non porteurs de « vacuoles » plus important après induction artificielle de la réaction acrosomique. Nos résultats ne sont pas incompatibles avec les résultats obtenus par l'équipe de Montjean et al. (2012). En effet, dans cette étude, le marquage à la lectine PSA a été effectué sans marquage de vitalité. Or, l'induction artificielle de la réaction acrosomique qui a été réalisée dans cette étude pourrait s'accompagner de la mort des spermatozoïdes les plus « fragiles ». Les spermatozoïdes dont la chromatine est mal condensée sont, on le sait, plus à risque de mort (Aitken 2006 ; Oliveira et de Mateo 2010 ; Aitken et Koppers 2011). Ainsi dans l'étude de Montjean et al., s'il existe une proportion plus importante de spermatozoïdes mobiles normaux et de spermatozoïdes à chromatine bien condensée après induction artificielle de la réaction acrosomique, ne serait-ce pas par mort des spermatozoïdes vacuolés, mal condensés et donc plus fragiles ? D'après nos résultats, nous nous orientons plutôt vers cette explication et sommes plus réservés que ces auteurs pour affirmer la nature acrosomique des « vacuoles ». Quoiqu'il en soit, nous avons montré que **les « vacuoles » spermatiques petites ou grandes n'étaient pas le témoin d'un statut acrosomique particulier et donc pas le témoin d'une meilleure ni d'une moins bonne capacité fécondante des spermatozoïdes.** Ceci corrobore les résultats de l'équipe de Mauri (2010) qui ne retrouvait pas de différence des taux de fécondation entre les techniques d'ICSI et d'IMSI.

IMSI : indications et résultats

De l'ensemble de ces données, découlent alors **plusieurs indications d'IMSI (article 8 et article 14 présenté en annexe).** L'IMSI et la sélection de spermatozoïdes mobiles de morphométrie normale et non porteurs de vacuoles serait indiquée **en cas d'échecs d'implantation embryonnaire post-ICSI.** C'est d'après notre revue de la littérature, **l'indication majeure de l'IMSI.** Plusieurs études randomisées incluant de larges effectifs (Antinori et al. 2008 ; Klement et al. 2013) vont dans ce sens. Par contre l'IMSI n'est pas indiquée en première intention pour les spermés « tout venant » (De Vos et al. 2013 ; Leandri et al. 2013).

L'IMSI pourrait aussi être potentiellement indiquée :

- chez les patients présentant une tératozoospermie

- chez les patients présentant de taux élevés de non condensation de la chromatine ou de la fragmentation de l'ADN spermatique

- chez les femmes âgées dont les capacités de réparation ovocytaire sont dépassées

- et chez les patients pour lesquels l'utilisation de spermatozoïdes congelés est indiquée.

En effet, nous avons montré que la congélation spermatique induisait une vacuolisation des spermatozoïdes et s'accompagnait d'une décondensation de leur chromatine (**article**

7). Ces potentielles indications d'IMSI méritent d'être évaluées séparément chez un grand nombre de patients et des études randomisées sont nécessaires pour les affirmer.

Perspectives

D'après nos travaux nous avons pu dégager **deux perspectives, la première fondamentale et la deuxième clinique.**

Perspective 1 : Vers une meilleure connaissance de l'épigénome du spermatozoïde en fonction de sa morphologie à fort grossissement :

D'abord, nous avons émis l'hypothèse que certaines marques épigénétiques impliquées dans la structuration de la chromatine pourraient différer d'un spermatozoïde à un autre en fonction de la présence ou non de vacuoles. Ainsi, les spermatozoïdes porteurs de « vacuoles » pouvaient constituer de bons modèles d'exploration de l'épigénome du gamète mâle.

Nous nous focaliserons sur les liens entre les vacuoles et les modifications épigénétiques (incorporation de tel ou tel variant d'histones et modifications biochimiques des histones persistants) impliquées dans le remodelage de la chromatine. En effet si nous avons montré que les larges et les petites « vacuoles » étaient en lien avec une non-condensation de la chromatine spermatique et un remplacement insuffisant des histones au cours de la spermiogenèse (marquage des histones au bleu d'aniline), et donc si les spermatozoïdes vacuolés sont bien épigénétiquement différents des spermatozoïdes non porteurs de « vacuoles », il serait intéressant de savoir quels sont ces histones retenus. D'après notre analyse de la littérature, le variant testis spécifique de l'histone H2B (hTSH2B) est un bon candidat. Il peut être retrouvé dans les spermatozoïdes matures (Singleton et al. 2007). Il a été montré que la décondensation du noyau spermatique après la fécondation se faisait plus rapidement dans les spermatozoïdes porteurs de hTSH2b. Ceci laisse supposer que hTSH2B pourrait avoir un rôle dans l'activation des gènes paternels au cours du développement embryonnaire (Singleton et al. 2007). Comme nous avons montré que les spermatozoïdes vacuolés retenaient plus d'histones dans leur noyau que les spermatozoïdes non porteurs de « vacuoles », nous avons décidé d'étudier la présence de hTSH2B et de TH2B dans ces spermatozoïdes en fonction de la présence ou non de « vacuoles ». Nous étudierons aussi d'autres marques épigénétiques (méthylation et acétylation de telle ou telle histone).

Nous utiliserons le **modèle bovin** qui semble représenter un excellent modèle d'étude des vacuoles spermatiques. En effet, d'après notre analyse de la littérature, la vacuole

spermatique n'est pas exclusivement humaine. Les spermatozoïdes de bovin ont été décrits comme pouvant présenter des vacuoles de nature nucléaire sous forme de poches ou de cratères (premier parallèle avec l'humain). Notons cependant que ces vacuoles nucléaires ont été décrites en microscopie optique en utilisant des techniques de colorations variées ou en microscopie électronique mais jamais sur des spermatozoïdes bovins vivants et donc potentiellement injectables. Ces vacuoles peuvent être observées dans 1%, 5%, 30% voire même 100% des spermatozoïdes bovins. De manière remarquable, ces vacuoles sont plus fréquentes chez les bovins infertiles, comparativement aux bovins fertiles (Parkinson 2000 ; Thundathil et al. 1998) (2ème parallèle). Enfin, l'injection en ICSI de spermatozoïdes bovins vacuolés donne des taux de blastulation plus faibles que l'injection de spermatozoïdes non vacuolés (3ème parallèle) (Thundathil et al. 1998). Outre ces similitudes, le modèle bovin permet, contrairement au modèle humain, l'étude du devenir des marques épigénétiques paternelles après fécondation. Chez le bovin, il est en effet possible de suivre les marques épigénétiques soit par fixation des embryons à différents stades après fécondation (Pichugin et al. 2010; Bošković et al., 2012), soit par microscopie 4D sur embryon vivant et d'évaluer l'effet du remodelage chromatinien sur le taux de blastulation (données non publiées).

Grâce à l'utilisation du modèle bovin, en parallèle à l'humain, nous espérons donc établir des liens entre les vacuoles et des marques épigénétiques. Dans un premier temps, parmi la dizaine de races bovines qui sera testée, nous sélectionnerons la race de bovin la mieux adaptée, c'est à dire celle dont la description morpho-fonctionnelle des vacuoles spermatiques présentera le plus de similitudes avec l'homme en termes de morphologie des vacuoles et de non-condensation de la chromatine. Dans un deuxième temps, nous décrirons chez l'homme et le bovin (après sélection de la race à l'étape 1) une dizaine de marques épigénétiques. Nous rechercherons des différences d'expression de ces marques en fonction de la présence ou non de vacuoles. Finalement, l'impact des vacuoles et le devenir des marques épigénétiques d'intérêt (déterminées à l'étape 2) au cours du développement embryonnaire seront évalués chez le bovin par une technique proche du « cell tracking in vivo ». Le suivi in vivo des marques épigénétiques du spermatozoïde bovin après fécondation sera réalisée à l'aide de l'injection intra-ovocytaire d'anticorps fluorescents Fabs, repérage morphologique du pronucléus mâle et suivi de la fluorescence des FAbs tout au long de la culture de l'embryon bovin jusqu'au stade blastocyste. Deux

groupes seront comparés : un groupe d'ovocytes fécondés et d'embryons issus de l'injection par des spermatozoïdes vacuolés et un groupe d'ovocytes fécondés et d'embryons issus de l'injection par des spermatozoïdes non vacuolés.

De ces données, nous espérons déterminer le « profil épigénétique du spermatozoïde » le plus apte à induire le développement d'un embryon capable de s'implanter. De cette mise en évidence, découleront alors peut être des tests diagnostiques permettant de préférer l'IMSI à l'ICSI. Nous avons très récemment soumis ce projet à l'agence de Biomédecine, pour tenter d'aller plus loin dans la description de l'épigénome spermatique humain en fonction de la morphologie spermatique (présence ou non de vacuoles).

Perspective 2 : Vers l'utilisation d'autres outils de sélection spermatique :

Deuxièmement, grâce à la collaboration de Mr Pierre Bon étudiant en thèse de physiques et de Mme Lucie de Laulanié, ingénieur, nous avons pu mettre au point une nouvelle technique d'observation des spermatozoïdes vivants mobiles : la microscopie à contraste de phase et densité. Cette nouvelle méthode d'observation spermatique nous a permis d'avoir une confirmation de la nature des « vacuoles » spermatiques. Cette technique consiste à observer les spermatozoïdes avec un microscope à contraste de phase. Un logiciel est ensuite utilisé pour coder en couleurs la densité de la structure observée.

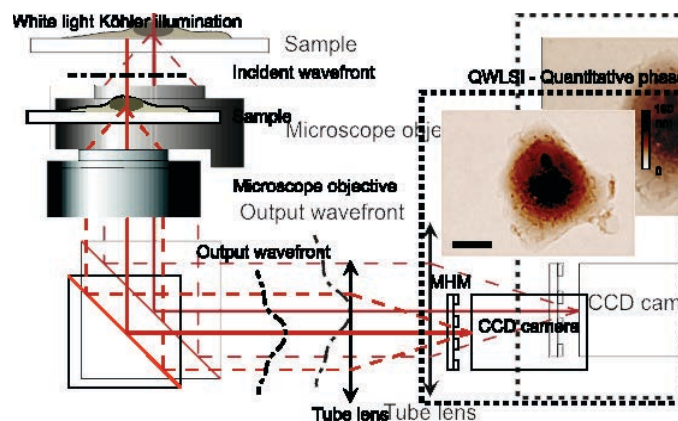


Figure 27 : Représentation schématique du principe optique de la microscopie à contraste de phase et densité. *Schéma de P. Bon.*

Dans cette étude, nous avons observé quasi-simultanément en DIC (MSOME) et en microscopie à contraste de phase et densité, 1000 spermatozoïdes mobiles provenant de 20 patients.

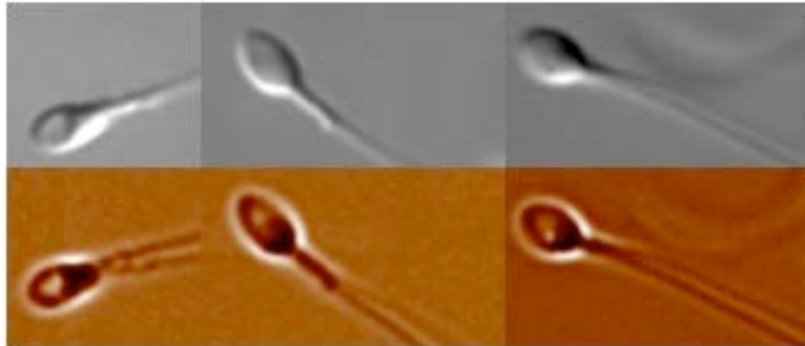


Figure 28: Photos de spermatozoïdes en DIC (en haut) et en contraste de phase et densité (en bas). *Photos de F. Boitrelle.*

A chaque fois, les « vacuoles » observées en DIC étaient superposables à des zones de moindre densité en contraste de phase à densité. Ainsi, les « vacuoles » décrites comme des concavités nucléaires sont bien des concavités vides ou en tout cas remplies d'une matière de densité beaucoup plus faible que celle du noyau. **Cette nouvelle technique de sélection des spermatozoïdes présenterait les avantages de l'IMSI sans les inconvénients (utilisation d'huile pour certains, longueur de la sélection, coût élevé de l'appareillage). En effet cette technique est adaptable sur n'importe quel micromanipulateur classique.** Son intérêt est à évaluer à plus grande échelle et à comparer aux techniques d'ICSI et d'IMSI en termes de grossesse et d'accouchements.

Conclusion

Comme nous l'avons montré ici, certaines anomalies grossières (visibles au grossissement de l'ICSI) des spermatozoïdes sont en lien avec des marques épigénétiques particulières (état de condensation de la chromatine) ou un contenu chromosomique particulier. Cependant, la sélection d'un spermatozoïde de morphologie normale en ICSI ne permet de s'assurer ni de son statut épigénétique, ni de l'intégrité de son ADN, ni de son contenu chromosomique, ni du statut réagi ou non de son acrosome. Depuis les années 2000, l'IMSI est proposée comme une méthode d'observation plus fine puisqu'elle permet de visualiser des « vacuoles » non visibles (pour la plupart) au grossissement classique de l'ICSI. De nombreux auteurs ont d'ailleurs publié des résultats favorables à l'IMSI en termes d'augmentation des taux de grossesses et de réduction des taux de fausses couches en cas d'échecs d'implantation embryonnaire en ICSI. Mais l'IMSI permet-elle pour autant de mieux sélectionner LE spermatozoïde ?

D'après nos résultats, nous répondons qu'il y a un réel gain dans ce sens. En effet, nous avons établi ici des liens forts entre la présence de « vacuoles » notamment et une marque épigénétique particulière : la non-condensation de la chromatine. Cette non-condensation de la chromatine peut être « innée » pour le spermatozoïde ou acquise après congélation/décongélation par exemple. Ainsi l'IMSI pourrait aussi être indiquée chez les patients dont le sperme présente des taux élevés de non condensation de la chromatine comme pour les spermes congelés. La non-condensation de la chromatine témoigne en fait d'un mauvais remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse. Ces histones persistantes ne sont pas, on l'a rappelé, distribuées au hasard le long du génome mais siègent au niveau des promoteurs des gènes du développement embryonnaire (Hammoud et al. 2011). Ainsi on comprend que la désélection des spermatozoïdes « vacuolés » pourrait permettre de désélectionner les spermatozoïdes les « moins épigénétiquement favorables » au bon développement embryonnaire et de sélectionner LE spermatozoïde (de morphologie normale sans vacuole) qui présenterait le moins de risque d'échec d'implantation embryonnaire mais aussi celui qui présenterait le moins de risque d'anomalies pour la descendance (Cassuto et al. 2014).

De plus, la non-condensation chromatiniennne peut induire une plus grande susceptibilité des spermatozoïdes aux dommages de l'ADN. Ainsi, il n'est pas surprenant que certains auteurs observent un intérêt à l'IMSI (par rapport à l'ICSI) en termes de grossesse évolutives chez les patients présentant des taux élevés de fragmentation de l'ADN

spermatique. En effet, chez ces patients, l'ADN des spermatozoïdes non porteurs de vacuoles serait moins fragmenté que celui des spermatozoïdes vacuolés ou que celui de spermatozoïdes sélectionnés comme normaux au grossissement de l'ICSI.

D'un autre côté, l'IMSI et la sélection de spermatozoïdes non porteurs de vacuoles (ou porteur d'une seule petite vacuole) ne permettrait pas de garantir leur contenu chromosomique ni de connaître leur statut acrosomique.

Finalement, nous avons mis au point une technique d'observation de la densité des spermatozoïdes mobiles. Cette technique méritera d'être évaluée et comparée à l'ICSI et à l'IMSI en termes d'amélioration du choix du spermatozoïde à injecter. D'autres techniques verront peut être le jour d'ici quelques années pour améliorer toujours un peu plus notre vision du spermatozoïde qui serait le moins à risque d'échec d'implantation embryonnaire ou d'anomalies pour la descendance. L'utilisation de modèles animaux nous permettra alors d'étudier les gamètes mais aussi et surtout les embryons issus de la fécondation de ces gamètes, ce qui est éthiquement impossible chez l'humain. Ceci nous permettra de connaître encore mieux la « carte d'identité » épigénétique mais aussi chromosomique et acrosomique du spermatozoïde avant injection. La connaissance de ces caractéristiques est un enjeu crucial en AMP puisqu'en terme d'épigénétique notamment, tout ne se voit pas à la naissance. Il apparaît effectivement primordial d'anticiper les risques épigénétiques et génétiques pour la descendance et cela passe par une meilleure connaissance des caractéristiques des gamètes mis en fécondation...

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFM : Atomic force microscopy, Microscopie à force atomique

AMP : Assistance Médicale à la procréation

AURKC : aurorakinase C

DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole

DFI: index de dénaturation de l'ADN

DIC: contraste interférentiel différentiel

DNMTs: DNA methyltransférases

ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology

FITC : Fluoresceine isothiocyanate

FISH : Fluorescence *in situ* Hybridization

FIV : Fécondation *in vitro*

IAM: index d'anomalies multiples

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IIU: Insémination intra-utérine

IMSI : Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection

MSOME : Motile Sperm Organellar Morphological Examination

OAT : Oligoasthénotéatozoospermie

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate Buffer Saline

lectine PSA : Pisum sativum agglutinin

PVP : Polyvinylpyrrolidone

ROS : substances réactives de l'oxygène

SCSA : sperm chromatin structure assay

SDS : Sodium DodecylSulfate

SpermFISH: Fluorescence *in situ* Hybridization sur spermatozoïdes

SSC : Sodium Saline Citrate

TdT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

TMS : Test de migration survie des spermatozoïdes

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling

WHO: World Health Organization

Publications et communications 2010-2014

Liste des publications

Publications dans des revues en Anglais avec comité de lecture

1. **Boitrelle F**, Ferfour F, Petit J, Tourain C, Bailly M, Bergère M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm-head vacuoles observed in motile spermatozoa under high-magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Human Reprod* 2011; 26: 1650-1658.
2. **Boitrelle F**, Albert M, Petit J, Ferfour F, Wainer R, Bailly M, Vialard F, Selva J. Small human sperm vacuoles observed under high magnification are pocket-like nuclear concavities linked to chromatin condensation failure. *Reprod biomed online*, 2013; 27: 201-211.
3. **Boitrelle F**, Pagnier M, Athiel Y, Swierkowski-Blanchard N, Alter L, Muratorio C, Torre A, Vialard F, Selva J, Albert M. Is a spermatozoon's morphology related to its chromatin status? *Asian Journal Andrology*, article soumis.
4. **Boitrelle F***, Hammoud I*, Ferfour F, Vialard F, Bergère M, Wainer M, Bailly M, Albert M, Selva J. Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia* 2013; 45: 163-170.
5. Chelli H, Ferfour F, **Boitrelle F**, Albert M, Molina Gomes D, Selva J, Vialard F. High-magnification sperm selection does not decrease the aneuploidy rate in patients who are heterozygous for reciprocal translocations. *JARG* 2013; 30 :525-530.
6. Guthauser B, **Boitrelle F**, Albert M, Ketata F, Meynant C, Selva J, Vialard F. Contraindication of ART following a sperm FISH analysis, even though only 12% of the spermatozoa had enlarged heads: a case report. *Syst Biol Reprod Med* 2013; 59: 214-217.
7. **Boitrelle F**, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergère M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa alters motile sperm organelle

morphology, decreases the number of top spermatozoa and induces nuclear vacuolisation and chromatin decondensation. *J Androl* 2012; 33: 1371-1378.

8. **Boitrelle F**, Guthauser B, Alter L, Bailly M, Bergère M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J. High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: confirmed and potential indications. A literature review. *Reprod biomed online* 2014; 28: 6-13.
9. **Boitrelle F**, Guthauser B, Alter L, Bailly M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J. The nature of human sperm head vacuoles: a systematic literature review. *Basic and Clinical Andrology* 2013; 23:3-12.
10. **Boitrelle F**, Albert M. MSOME and sperm chromatin status
Non-invasive sperm selection for in-vitro Fertilization, Borges Jr and Agarwal A eds, Springer 2014. Chapitre de livre en Anglais sur invitation, envoyé à l'éditeur en octobre 2013.

Publications dans des revues en Français

11. **Boitrelle F**, Vialard F, Bergère M, Atam-K S, Ferfour F, Bailly M, Selva J, Albert M. Le spermogramme en 2010. *Gynécologie obstétrique pratique* 2010; 228: 7-10.
12. Albert M, **Boitrelle F**. Comment interpréter un spermogramme ? *Réalités en Gynécologie Obstétrique* 2011; 153: 1-5.
13. **Boitrelle F**, Marchetti P, Mitchell V, Leroy-Martin B, Marchetti C. Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP. *Physiologie, Pathologie et Thérapie de la Reproduction chez l'Humain, Editeur Springer, 2011, chapitre 30.*
14. **Boitrelle F**, Ferfour F, Salama S, Vialard F, Bergère M, Bailly M, Wainer R, Selva J, Albert M. De la nature des vacuoles spermatiques aux résultats et indications de l'IMSI. *Andrologie* 2011; 4: 234-239.

Liste des communications orales

1. **Boitrelle F***, Albert M, Selva J. IMSI : How ? Why ? When ?
Curso práctico de IMSI, congrès théorico-pratique international, Madrid, novembre 2010.
2. **Boitrelle F***, Selva J, Bergère M, Albert M. IMSI : indications et résultats.
2^{èmes} assises de Gynécologie et Obstétrique, Lille, novembre 2010.
3. **Boitrelle F***, Bergère M, Vialard F, Bailly M, Selva J, Albert M. Evaluation morphologique du spermatozoïde : fixé ou vivant ?
XXVII^{ème} congrès de la Société Française d'Andrologie, Liège, janvier 2011.
4. **Boitrelle F***, Ferfour F, Vialard F, Bergère M, Bailly M, Albert M, Selva J. Nature nucléaire des larges vacuoles observées sur les têtes spermatiques en MSOME.
XXVII^{ème} congrès de la Société Française d'Andrologie, Liège, janvier 2011.
Sélection du mémoire pour communication orale. Obtention du prix Master 2011.
5. Albert M*, **Boitrelle F**. Standard du spermogramme et du spermocytogramme.
3^{ème} congrès du GIERAF, Cotonou, février 2011.
6. **Boitrelle F***, Vialard F, Bergère M, Atam-K S, Ferfour F, Bailly M, Selva J, Albert M. Le spermogramme en 2010.
XX^{èmes} journées de Gynécologie obstétrique pratique, Paris, février 2011.
7. **Boitrelle F***, Ferfour F, Petit JM, Bailly M, Bergère M, Vialard F, Selva J, Albert M. Large human sperm vacuoles observed in living spermatozoa under high-magnification are nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation.
27th annual meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, Stockholm, juillet 2011.

8. **Boitrelle F***, Vialard F, Bergère M, Selva J, Albert M. De la nature des larges vacuoles spermatiques à l'implantation embryonnaire.
Staff SAMPIL, Neuilly sur Seine, novembre 2011.
9. **Boitrelle F***, Albert M, Vialard F, Selva J. Condensation de la chromatine du spermatozoïde humain : mécanismes épigénétiques et lien avec la morphologie spermatique.
Colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française, Paris, septembre 2012.
10. **Boitrelle F***, Albert M, Vialard F, Selva J. Nature des petites vacuoles observées sur les têtes spermatiques en MSOME.
18^{èmes} Journées du Collège d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Marseille, mars 2013.
11. **Boitrelle F***, Albert M, Vialard F, Selva J. Débat: La morphologie est le meilleur critère de sélection des spermatozoïdes à injecter: OUI.
Journées MBR info, Paris, février 2014.
12. **Boitrelle F***, Albert M, Vialard F, Selva J. MSOME et IMSI.
25^{èmes} Journées Liégeoises de gynécologie et assistance médicale à la procréation, Liège, mars 2014.
13. **Boitrelle F***, Albert M, Vialard F, Selva J. IMSI: indications et résultats.
Journées parisiennes d'assistance médicale à la procréation, Paris, mai 2014.

Références bibliographiques

Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Mercier G, Porcu G, Saias-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Guichaoua MR. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa. *J Androl* 2007; 28:600-606.

Ainsworth C. Cell biology: the secret life of sperm. *Nature* 2005; 436:770-771.

Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:65-70.

Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006; 29:69-75; discussion 105-108.

Aitken RJ et Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011; 13:36-42.

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2008; 16 :835-841.

Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990; 13:452-462.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001; 16: 2710-2717.

Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009; 91:1077-1084.

Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2011; 22:472-476.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 2001; 345:1067-1068.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002; 23:1-8.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003; 80:1413-1419.

Ben Khelifa M, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, Lunardi J, Ray PF. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2011; 17:762-768.

Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005; 20: 185-190.

Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006; 21: 1787-1790.

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13:3406-3413.

Biermann K, Steger K. Epigenetics in male germ cells. *J Androl* 2007; 28:466-480.

Bisson JP, David G, Luciani JM. L'appareil génital masculin. Dans : Précis d'histologie, éditions Masson, 1980.

Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril*. 2013; 99:624-631.

Boitrelle F, Marchetti P, Mitchell V, Leroy-Martin B, Marchetti C. Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP. Dans: *Physiologie, Pathologie et Thérapie de la Reproduction chez l'Humain*, éditions Springer, 2011.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22:1506-1512.

Bošković A, Bender A, Gall L, Ziegler-Birling C, Beaujean N, Torres-Padilla ME. Analysis of active chromatin modifications in early mammalian embryos reveals uncoupling of H2A.Z acetylation and H3K36 trimethylation from embryonic genome activation. *Epigenetics* 2012; 7: 747-757.

Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22:604-610.

Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012; 97:267-274.

Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, Larue L, Barak Y. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 2009; 92:1616-1625.

Cassuto NG, Le Foll N, Chantot-Bastaraud S, Balet R, Bouret D, Rouen A, Bhourri R, Hyon C, Siffroi JP. Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology examination. *Fertil Steril* 2011; 96:826-832.

Cassuto NG, Hazout A, Bouret D, Balet R, Larue L, Benifla JL, Viot G. Low birth defects by deselecting abnormal spermatozoa before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2014; 28:47-53.

Chelli MH, Albert M, Ray PF, Guthauser B, Izard V, Hammoud I, Selva J, Vialard F. Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome? *Fertil Steril* 2010; 93:1347.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112:35-51.

Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988; 20:211-217.

Dadoune JP, Demoulin A. Structure et fonctions du testicule. Dans : *Reproduction chez les mammifères et l'homme*, éditions Ellipse, 2001.

Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, Guichaoua M, Sèle B, Rousseaux S. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002; 17:1292-1298.

De Vos A, Van de Velde H, Bocken G, Eylenbosch G, Franceus N, Meersdom G, Tistaert S, Vankelecom A, Tournaye H, Verheyen G. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2013; 28:617-626.

Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sèle B, Jouk PS et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007; 39:661-665.

El Khattabi L, Dupont C, Sermondade N, Hugues JN, Poncelet C, Porcher R, Cedrin-Durnerin I, Lévy R, Sifer C. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure? *Fertil Steril* 2013; 100:62-68.

ESHRE Capri Workshop Group (Collins J, Evers JL, Leridon H, Lutz W, te Velde E, Thevenon O, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Geraedts JP, Gianaroli L, Glasier A, Sunde A, Tarlatzis B, Van Steirteghem A, Veiga A, Collins J, Crosignani PG). Europe the continent with the lowest fertility. *Hum Reprod Update* 2010; 16:590-602.

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *Int Braz J Urol* 2007; 33:364-374; discussion 375-376.

Evenson DP, Larson K, Jost LK. The sperm chromatin structure assay (SCSA): clinical use for detecting sperm DNA fragmentation related to male infertility and comparisons with other techniques. *Andrology Lab Corner. J Androl* 2002; 23:25-43.

Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002; 360:151-159.

Frainais C, Vialard F, Rougier N, Aegerther P, Damond F, Ayel JP, Yazbeck C, Hazout A, Selva J. Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 415-421.

Franco JG, Jr., Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL, Oliveira JB et al. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl* 2012 ; 35:46-51.

Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008 ; 17:610-616.

Gatewood JM, Schroth GP, Schmid CW, Bradbury EM. Zinc-induced secondary structure transitions in human sperm protamines. *J Biol Chem* 1990; 265:20667-20672.

Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing--thawing procedures. *Reprod Biomed Online* 2013a ; 26:240-246.

Gatimel N, Leandri RD, Foliguet B, Bujan L, Parinaud J. Sperm cephalic vacuoles: new arguments for their non acrosomal origin in two cases of total globozoospermia. *Andrology* 2013b; 1:52-56.

Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, Ferraretti AP. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2012; 97:1067-1073.

Gilbert M. La fécondation : conception d'un nouvel organisme. Dans : *Biologie du développement*, éditions de Boeck, 2ème édition, 2004.

Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 2005; 20:1144-1147.

Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:481-514.

Guichaoua MR, Mercier G, Geoffroy-Siraudin C, Paulmyer-Lacroix O, Lanteaume A, Metzler-Guillemain C, Perrin J, Achard V. Macrocephalic spermatozoa. What would be the impact on reproduction?. *Gynecol Obstet Fertil*. 2009; 9:703-711.

Gusse M, Sautiere P, Belaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevaillier P. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* 1986; 884:124-134.

Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril* 2012; 97:275-281.

Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 2001; 46:99-104.

Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod*. 2011; 26: 2558-2569.

Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 19-25.

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2571-2587.

Holstein AF et Roosen-Runge EC. Dans: Atlas of Human Spermatogenesis, editions Grosse, 1981.

Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62:324-332.

Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, Wolf JP. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online* 2010; 20:132-137.

Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:591-596.

Klement AH, Koren-Morag N, Itsykson P, Berkovitz A. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus intracytoplasmic sperm injection: a step toward a clinical algorithm. *Fertil Steril* 2013; 99 :1290-1293.

Leandri RD, Gachet A, Pfeffer J, Celebi C, Rives N, Carre-Pigeon F, Kulski O, Mitchell V, Parinaud J. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) beneficial in the first ART cycle? a multicentric randomized controlled trial. *Andrology* 2013; 1:692-697.

Louis JF, Thoma ME, Sorensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, Keiding N, Buck Louis GM. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. *Andrology* 2013; 1:741-748.

Magli MC, Crippa A, Muzii L, Boudjema E, Capoti A, Scaravelli G, Ferraretti AP, Gianaroli L. Head birefringence properties are associated with acrosome reaction, sperm motility and morphology. *Reprod Biomed Online* 2012; 24:352-359.

Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JG Jr. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 150:42-46.

Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M, Dalleac A, Menezo Y. Sperm vacuoles are linked to

capacitation and acrosomal status. *Hum Reprod* 2012; 27:2927-2932.

Morozumi K, Yanagimachi R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:14209-14214.

Morse-Gaudio M, Risley MS. Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J Cell Sci* 1994; 107:2887-2898.

Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 2007; 450:119-123.

Oliva R et de Mateo S. Medical implications of sperm nuclear quality. Dans : *Epigenetics and human reproduction*, editions Springer-Verlag, 2010.

Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002; 360:772-777.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-18.

Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2012; 18:485-503.

Parkinson TJ. Nuclear vacuolation as a cause of sterility in an angus bull. *Vet J* 2000; 159: 207-210.

Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Simeon N, Mace B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod* 2011; 26:47-58.

Perdrix A, Travers A, Clatot F, Sibert L, Mitchell V, Jumeau F, Mace B, Rives N. Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles. *Andrology* 2013; 1:57-66.

Pichugin A, Le Bourhis D, Adenot P, Lehmann G, Audouard C, Renard JP, Vignon X, Beaujean N. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. *Reproduction*. 2010; 139:129-137.

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28:1057-1068.

Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res* 2011; 727:62-71.

Ramos L, van der Heijden GW, Derijck A, Berden JH, Kremer JA, van der Vlag J, de Boer P. Incomplete nuclear transformation of human spermatozoa in oligo-astheno-teratospermia: characterization by indirect immunofluorescence of chromatin and thiol status. *Hum Reprod* 2008 ; 23:259-270.

Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R, Fox MF, Kotzè GM, Brusnický J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1984; 66:162-164.

Riggs AD, Martinssen RA, Russo VEA. Introduction. Dans: *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, Cold Spring Harbor press, 1996, NY, USA.

Robin G, Boitrelle F, Leroy X, Peers MC, Marcelli F, Rigot JM, Mitchell. Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis. *Ann Pathol* 2010; 30:182-195.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3:1597-1605.

Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L. Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33:89-101.

Setti AS1, Figueira RC, Braga DP, Aoki T, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection is beneficial in cases of advanced maternal age: a prospective randomized study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 171:286-290.

Shi Q et Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; 121:655-666.

Singleton S, Mudrak O, Morshedi M, Oehninger S, Zalenskaya I, Zalensky A. Characterisation of a human sperm cell subpopulation marked by the presence of the TSH2B histone. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:392-397.

Talebi AR, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, Ghasemzadeh J, Firoozabadi RD, Moein MR. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1:462-470.

Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Fenning N, Nastri CO, Martins WP.

Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 7:CD010167.

Tempest HG et Martin RH. Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21:223-227.

Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S, Kerr AR, Deaton A, Andrews R, James KD, et al. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 2010; 464:1082-1086.

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6:811-816.

Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 1998; 50:328-333.

Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:617-627.

Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnon F, Lobaccaro JM, Volle DH. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 29:150.

Weissenberg R, Aviram A, Golan R, Lewin LM, Levron J, Madgar I, Dor J, Barkai G, Goldman B. Concurrent use of flow cytometry and fluorescence in-situ hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol Hum Reprod*. 1998; 4:61-66.

Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:253-262.

World Health Organisation. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple, Cambridge University Press, 2000, Cambridge, UK.

World Health Organisation. Mother or nothing: the agony of infertility. *WHO Bulletin* 2010a; 88-12: 877-953.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition. Cambridge University Press, 2010b, Cambridge, UK.

Yurov YB, Saias MJ, Vorsanova SG, Erny R, Soloviev IV, Sharonin VO, Guichaoua MR, Luciani JM. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:665-668.

Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 2002; 277:43474-43480.

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23:2663-2668.

Annexes

Article 9

The nature of human sperm head vacuoles: a systematic literature review.

Boitrelle F, Guthauser B, Alter L, Bailly M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J.

Basic and Clinical Andrology 2013; 23:3-12.

Article 10

MSOME and sperm chromatin status.

Boitrelle F, Albert M.

Non-invasive sperm selection for in-vitro Fertilization, Borges Jr and Agarwal A eds, Springer 2014. Chapitre de livre en Anglais sur invitation, envoyé à l'éditeur en octobre 2013.

Article 11

Le spermogramme en 2010.

Boitrelle F, Vialard F, Bergère M, Atam S, Ferfour F, Bailly M, Selva J, Albert M.

Gynécologie obstétrique pratique 2010; 228: 7-10.

Article 12

Comment interpréter un spermogramme ?

Albert M, **Boitrelle F.**

Réalités en Gynécologie Obstétrique 2011; 153: 1-5.

Article 13

Explorations fonctionnelles spécialisées du sperme et AMP.

Boitrelle F, Marchetti P, Mitchell V, Leroy-Martin B, Marchetti C.

Physiologie, Pathologie et Thérapie de la Reproduction chez l'Humain,

Editeur Springer, 2011, chapitre 30.

Article 14

De la nature des vacuoles spermatiques aux résultats et indications de l'IMSI.

Boitrelle F, Ferfour F, Salama S, Vialard F, Bergère M, Bailly M, Wainer R, Selva J,
Albert M.

Andrologie 2011; 4: 234-239.

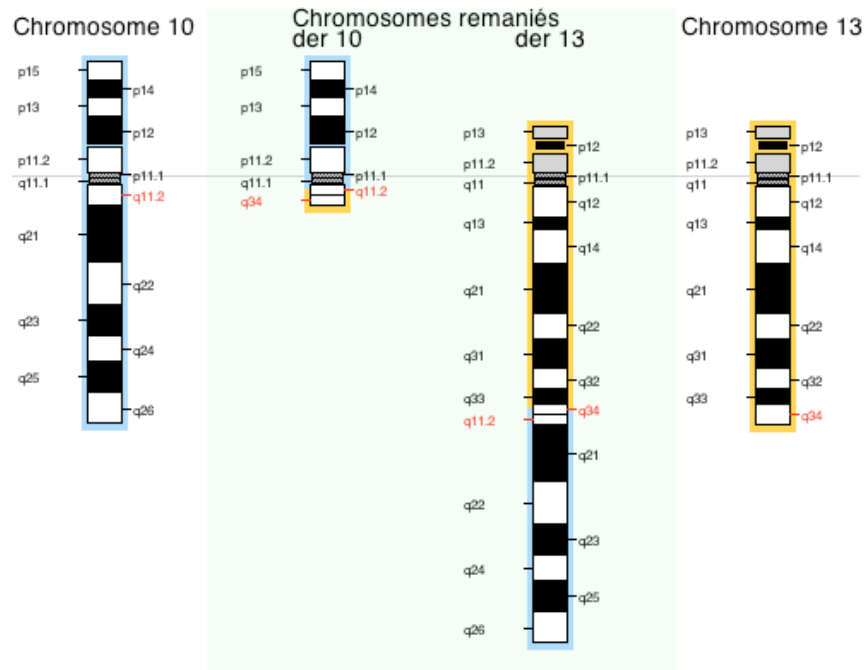
Etude HC forum (article 5)

Patient 1

Le risque (avec un intervalle de confiance de 95%) de survenue d'un enfant porteur d'un Syndrome Polymalformatif-Retard Mental est de : **14.59% [9.42-21.92]** si la translocation est d'origine paternelle.

Sur les 12 déséquilibres théoriquement possibles :

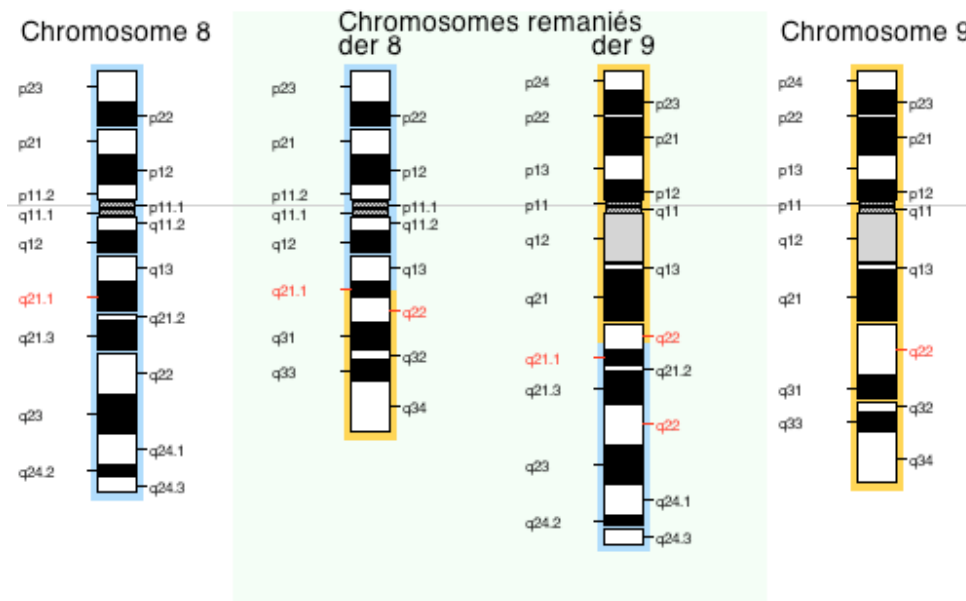
- 6 sont potentiellement viables et aucun n'a été observé à la naissance.
- 2 sont potentiellement viables selon le mode **adjacent 1**, mode de déséquilibre le plus probable et aucun n'a été observé à la naissance.



Patient 2

Le mode de déséquilibre à terme le plus probable est : **adjacent 1** (fiabilité de la prédiction = 73.9 %) ;

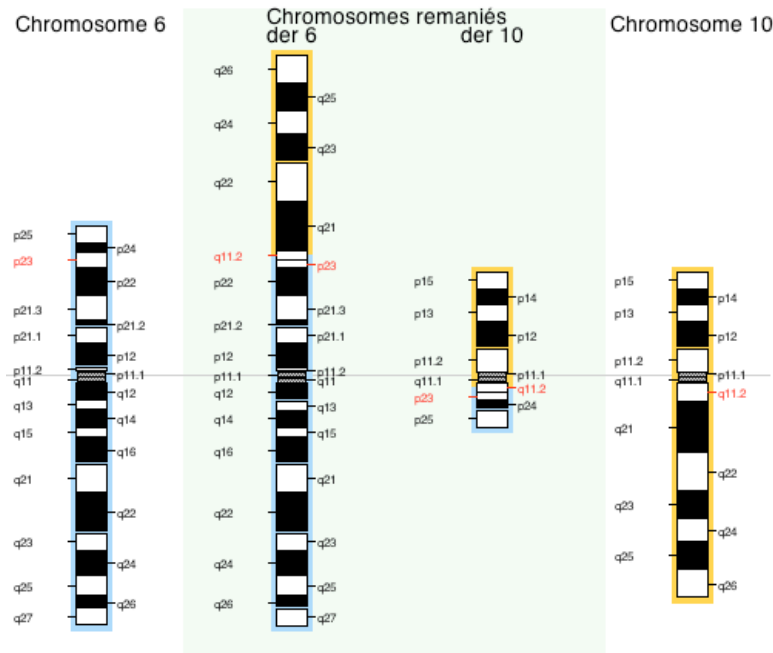
- 2 / 2 des déséquilibres **adjacent 1** sont potentiellement viables (100.0 %)



Patient 3

Sur les 12 déséquilibres théoriquement possibles :

- 5 sont potentiellement viables et aucun n'a été observé à la naissance.
- 2 sont potentiellement viables selon le mode **adjacent 1** , mode de déséquilibre le plus probable et aucun n'a été observé à la naissance.

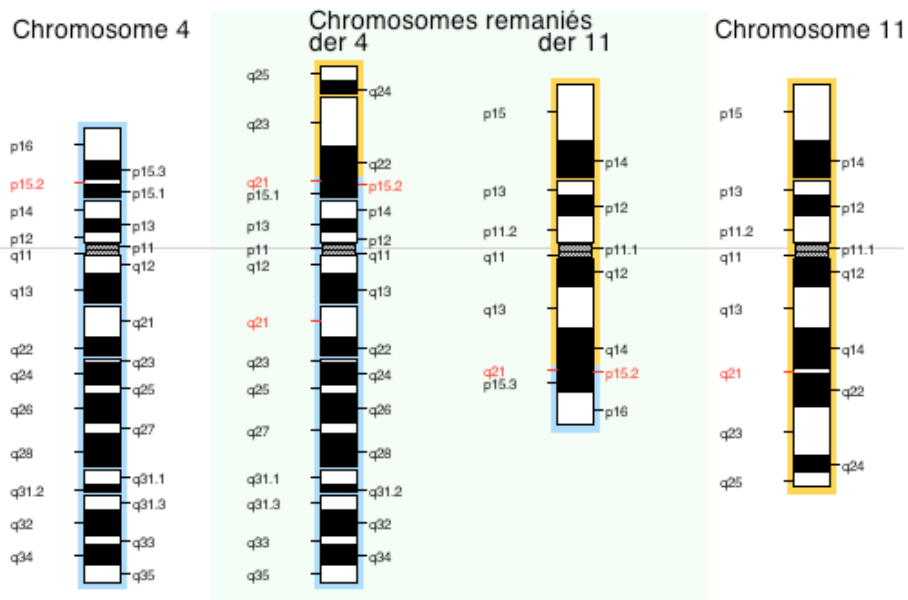


Patient 4

Le risque (avec un intervalle de confiance de 95%) de survenue d'un enfant porteur d'un Syndrome Polymalformatif-Retard Mental est de : **7.93% [5.39-11.54]** si la translocation est d'origine paternelle.

Sur les 12 déséquilibres théoriquement possibles :

- 4 sont potentiellement viables et aucun n'a été observé à la naissance.
- 2 sont potentiellement viables selon le mode **adjacent 1** , mode de déséquilibre le plus probable et aucun n'a été observé à la naissance.

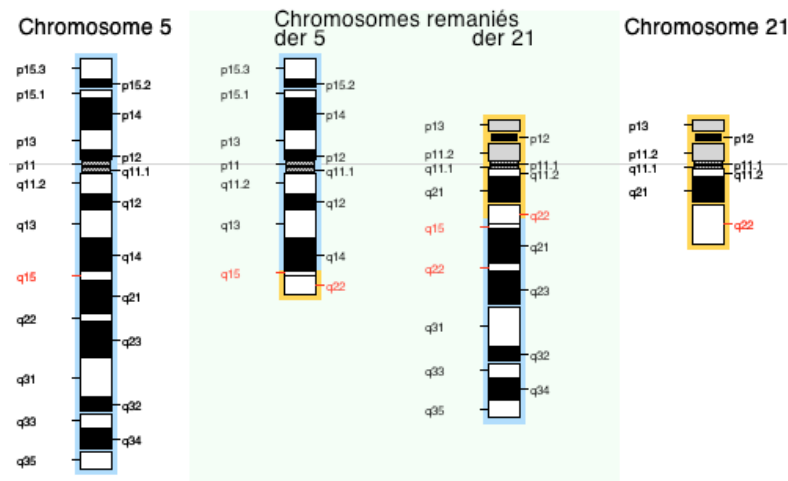


Patient 5

Le risque (avec un intervalle de confiance de 95%) de survenue d'un enfant porteur d'un Syndrome Polymalformatif-Retard Mental est de : **12.77% [7.61-20.65]** si la translocation est d'origine paternelle.

Sur les 12 déséquilibres théoriquement possibles :

- 7 sont potentiellement viables et aucun n'a été observé à la naissance.
- 2 sont potentiellement viables selon le mode **3:1 échange** , mode de déséquilibre le plus probable et aucun n'a été observé à la naissance.

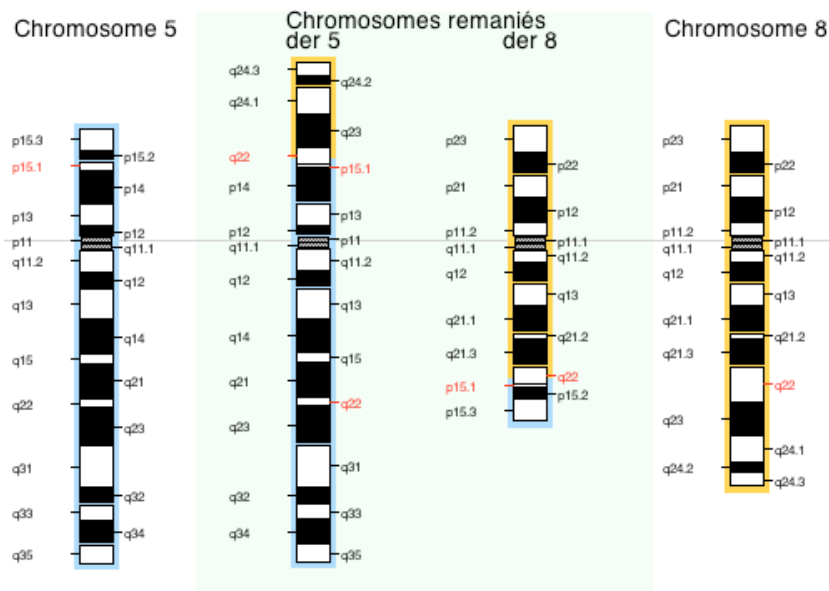


Patient 6

Le risque (avec un intervalle de confiance de 95%) de survenue d'un enfant porteur d'un Syndrome Polymalformatif-Retard Mental est de : **12.02% [8.70-16.38]** si la translocation est d'origine paternelle.

Sur les 12 déséquilibres théoriquement possibles :

- 4 sont potentiellement viables et aucun n'a été observé à la naissance.
- 2 sont potentiellement viables selon le mode **adjacent 1** , mode de déséquilibre le plus probable et aucun n'a été observé à la naissance.



« Ce serait théoriquement l'un des plus grands triomphes de l'humanité, l'une des libérations les plus tangibles à l'égard de la contrainte à laquelle est soumise notre espèce, si l'on pouvait élever l'acte de procréation au rang d'une action volontaire et intentionnelle et le dégager de son intrication avec la satisfaction d'un besoin naturel. »

Sigmund Freud, 1898, Résultats, Idées, Problèmes.